

10 / 548748

PCT/EP200 4 / 0 0 2 4 3 6

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

08 SEP 2005

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



BEST AVAILABLE COPY

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

Aktenzeichen:	103 11 118.2
Anmeldetag:	12. März 2003
Anmelder/Inhaber:	BASF Plant Science GmbH, 67056 Ludwigshafen/DE
Bezeichnung:	Verfahren zur Erhöhung der Resistenz gegen Stressfaktoren in Pflanzen
IPC:	C 07 K, C 12 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 25. März 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

Verfahren zur Erhöhung der Resistenz gegen Streßfaktoren in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Streßfaktor in Pflanzen, bevorzugt gegen pflanzliche Pathogene, durch Erhöhung der Expression mindestens eines Bax-Inhibitor 1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt. Die Erfindung betrifft ferner rekombinante Expressionskassetten und Vektoren, die eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors umfassen, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist. Die Erfindung betrifft ferner mit besagten Expressionskassetten oder Vektoren transformierte rekombinante Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder rekombinantes Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

25 Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika. Oft sind die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzkrankheiten führen zu Ernteverlusten in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken. Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfraß in Tabak durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen (Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.

40 Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen, vor allem Pilzpathogene, verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endogene Botenstoffe wie Jasmonat (JA) oder

Salizylsäure (SA) vermittelt werden (Ward et al. (1991) Plant Cell 3:1085-1094; Uknes et al. (1992) Plant Cell 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-thiocarbonsäure-S-methylester (BTH; Bion®) (Friedrich et al. (1996) Plant J 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) Plant J 10:71-82) bewirkt werden. Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hochregulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.

10

In Gerste ist der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Géns bedingt eine erhöhte, rassen-unspezifische Resistenz gegen zahlreiche Mehltauisolat

15

(Büschges R et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790).

20

Das Mlo-Gen ist beschrieben (Büschges R et al. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Mlo-Homologe aus anderen Getreidearten wurden isoliert. Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552). Nachteilig ist, dass Mlo-defiziente Pflanzen auch in Abwesenheit eines Pathogens den o.g.

25

Abwehrmechanismus initiieren, was sich in einem spontanen Absterben von Blattzellen äußert (Wolter M et al. (1993) Mol Gen Genet 239:122-128). Dadurch erleiden mlo-resistente Pflanzen eine Ertragseinbuße von ca. 5% (Jörgensen JH (1992) Euphytica 63: 141-152). Das spontane Absterben der Blattzellen bedingt ferner eine nachteilige Hypersuszeptibilität gegen nekrotrophe und hemibiotrophe Pathogene wie *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*) oder *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*) (Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133).

30

35

Faktoren die einen der mlo-Resistenz vergleichbaren Effekt gegen nekrotrophe Pilze vermitteln, konnten bislang nicht identifiziert werden. Dies mag an dem besonderen

40

Infektionsmechanismus der nekrotrophen Pilze liegen: Anstelle einer Appressorien-vermittelten Penetration infundieren sie zunächst die pflanzliche Wirtszelle mit Mykotoxinen und Enzymen, was zu einem Absterben der Zelle führt. Erst danach wird die Zelle penetriert (Shirasu K and Schulze-Lefert P (2000) Plant Mol Biol 44:371-385). Ähnliche Infektionsstrategien verfolgen

3

bakterielle Pathogene wie *Erwinia carotovora* (Whitehead NA et al. (2002) *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 223-231). Eine Penetrationsresistenz mit Hilfe von Papillenbildung etc. stellt hier keine effiziente Abwehrstrategie dar.

5

Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist ein essentieller Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase und steht damit der Zellteilung als negativ regulierender Mechanismus gegenüber. Im vielzelligen Organismus ist die Apoptose ein natürlicher Bestandteil der Ontogenese und u.a. an der Entwicklung der Organe und der Beseitigung von gealterten, infizierten oder mutierten Zellen beteiligt. Durch die Apoptose wird eine effiziente Elimination von unerwünschten Zellen erreicht. Eine Störung oder Inhibition der Apoptose trägt zur Pathogenese verschiedener Erkrankungen bei, unter anderem zur Karzinogenese. Die Haupteffektoren der Apoptose sind Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen, die sogenannten Caspasen. Ihre Aktivierung kann durch mindestens zwei Apoptose-Signalwege stattfinden: Zum einen durch die Aktivierung der TNF- (Tumor Necrosis Factor) Rezeptorfamilie, zum anderen spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle. Die Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges wird durch Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. Diese Proteinfamilie besteht aus anti-apoptotischen sowie pro-apoptotischen Proteinen wie z.B. Bax. Im Falle eines apoptotischen Stimulus findet eine allosterische Konformationsänderung des Bax-Proteins statt, welche zur Verankerung des Proteins in der mitochondrialen Außenmembran und seiner Oligomerisierung führt. Durch diese Oligomere werden pro-apoptotischen Moleküle aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt, die eine apoptotische Signalkaskade und letztlich die Degradierung spezifischer zellulärer Substrate bedingen, was den Zelltod zur Folge hat. Der Bax Inhibitor-1 BI1 wurde über seine Eigenschaft isoliert, die pro-apoptotische Wirkung von BAX zu inhibieren (Xu Q & Reed JC (1998) *Mol Cell* 1(3): 337-346). BI1 stellt ein hochkonserviertes Protein dar. Es findet sich überwiegend als integraler Bestandteil intrazellulärer Membranen. BI1 interagiert mit bcl-2 und bcl-xl. Überexpression von BI1 in Säugetierzellen unterdrückt die pro-apoptotische Wirkung von BAX, Etoposid und Staurosporin, aber nicht von Fas-Antigen (Roth W and Reed JC (2002) *Nat Med* 8: 216-218). Die Inhibition von BI1 durch antisense-RNA hingegen induziert Apoptose (Xu Q & Reed JC (1998) *Mol Cell* 1(3):337-346). Die ersten pflanzlichen Homologen von BI1 wurden aus Reis und *Arabidopsis* isoliert (Kawai et al. (1999) *FEBS Lett* 464:143-147;

10

15

20

25

30

35

40

Sanchez et al (2000) Plant J 21:393-399). Diese pflanzlichen Proteine supprimieren BAX-induzierten Zelltod in Hefe. Die Aminosäure-Sequenzhomologie zu menschlichem Bcl-2 beträgt ca. 45%. Das Arabidopsis-Homolog AtBcl2 vermag in rekombinanten Pflanzen die pro-apoptotische Wirkung von BAX aus Maus zu supprimieren (Kawai-Yamada et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(21):12295-12300). Das Reis (Oryza sativa) Bcl2-Homolog OsBcl2 wird in allen pflanzlichen Geweben exprimiert (Kawai et al. (1999) FEBS Lett 464: 143-147). Beschrieben sind ferner Bcl2-Gene aus Gerste (Hordeum vulgare; GenBank Acc.-No.: AJ290421), Reis (GenBank Acc.-No.: AB025926), Arabidopsis (GenBank Acc.-No.: AB025927), Tabak (GenBank Acc.-No.: AF390556) und Raps (GenBank Acc.-No.: AF390555, Bolduc N et al. (2003) Planta 216:377-386). Die Expression von Bcl2 in Gerste wird infolge einer Infektion mit Mehltau hochreguliert (Hückelhoven R et al. (2001) Plant Mol Biol 47(6):739-748).

WO 00/26391 beschreibt die Überexpression der anti-apoptotischen Gene Ced-9 aus C. elegans, sfiAP aus Spodoptera frugiperda, bcl-2 aus Mensch sowie bcl-xl aus Huhn in Pflanzen zur Erhöhung der Resistenz gegen nekrotrophe bzw. hemibiotrophe Pilze. Pflanzliche Bcl2 Homologe werden nicht offenbart. Die Expression erfolgt unter Kontrolle konstitutiver Promotoren. Beschrieben ist ferner die Expression eines Bcl2 Proteins aus Arabidopsis unter dem starken konstitutiven 35S CaMV Promotor in Reiszellen und eine dadurch induzierte Resistenz gegen Zelltod induzierende Substanzen aus Magnaporthe grisea (Matsumura H et al. (2003) Plant J 33:425-434).

Überraschenderweise wurde im Rahmen dieser Erfindung gefunden, dass eine konstitutive Expression eines Bcl2-Proteins zwar eine Resistenz gegen nekrotrophe Pilze bedingt, jedoch ein Brechen der mlo-vermittelten Resistenz gegen obligat-biotrophen Echten Mehltau (siehe Vergleichsversuch 1) zur Folge hat. Dies stellt den wirtschaftlichen Nutzen der im Stand der Technik beschriebenen Verfahren in Frage.

Es bestand die Aufgabe, Verfahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine effiziente Abwehr pflanzlicher Pathogene (bevorzugt nekrotropher Pathogene) ermöglichen, ohne eine ggf. bestehende Resistenz gegen andere Pathogene (wie beispielsweise biotrophe Pathogene) zu brechen. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

5

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Streßfaktor in Pflanzen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfaßt sind

5

a) Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines Bax Inhibitor-1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt, und

10

b) Auswahl der Pflanzen, bei denen im Vergleich zur Ausgangspflanze eine Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Streßfaktor besteht oder erhöht ist.

15

Bevorzugt ist der biotische oder abiotische Streßfaktor ein Pathogen, besonders bevorzugt ein Pathogen ausgewählt aus der Gruppe der nekrotrophen und hemibiotrophen Pathogene.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion des BI1-Proteins wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifisch, besonders bevorzugt mesophyll-spezifisch, beispielsweise durch rekombinante Expression einer für besagtes BI1-Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz unter

25

Kontrolle eines wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifischen Promotors, bevorzugt unter Kontrolle eines mesophyll-spezifischen Promotors.

30

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines pflanzlichen BI1-Proteins kombiniert werden mit einem mlo-resistenten Phänotyp und so eine kombinierte Resistenz gegen sowohl nekrotrophe als auch biotrophe Pathogene gewähren.

35

Das BI1-Protein aus Gerste (hvBI1) wird vorwiegend im Mesophyll exprimiert (Beispiel 6) und infolge einer Infektion mit *Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* f. *sp.hordei* hochreguliert (Beispiel 2). Die rekombinante mesophyll-spezifische Überexpression in mlo-resistenter Gerste führt - neben der Resistenz gegen

40

insbesondere nekrotrophe und hemibiotrophe Pathogene - zu einer *Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* f. *sp.hordei* -resistenten Pflanze, die keine nekrotischen Flecken („mlo-Flecken“; negative Begleiterscheinung der mlo-Resistenz) zeigt. Unter Ausnutzen dieses Effekts lassen sich die negativen Begleiterscheinungen

der mlo-vermittelten Resistenz (Ertragseinbuße von ca. 5%, Jörgensen JH (1992) Euphytica 63: 141-152); Hypersuszeptibilität gegen nekrotrophe Pilze, Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J et al. (2001)

- 5 Phytopathology 91:127-133) unterdrücken, ohne dass die mlo-Resistenz selber beeinträchtigt wird.

- 10 Ferner kann überraschenderweise gezeigt werden, dass eine Überexpression von BI1 eine Resistenz gegen Streßfaktoren wie nekrosen-auslösende Agenzien (isoliert z.B. aus nekrotrophen Schadpilzen; Beispiel 2) zur Folge hat.

- 15 Das erfindungsgemäße Verfahren bietet demnach eine effiziente biotechnologische Strategie der Resistenz gegen Nekrotisierung durch endogenen, abiotischen und biotischen Streß - beispielsweise mlo-Flecken, Ozonschäden, nekrotrophe und hemibiotrophe Schadorganismen.

- 20 BI1-Proteine scheinen zentrale Regulatoren der rasse-unspezifischen Pilzresistenz in Pflanzen zu sein. Dies ermöglicht eine breite Einsetzbarkeit in biotechnologischen Strategien zur Erhöhung der Pathogenresistenz in Pflanzen insbesondere der Pilzresistenz. Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf alle Pflanzenarten angewendet werden. BI1-Proteine wurden in zahlreichen Pflanzen - Monokotyledonen und
- 25 Dikotyledonen - identifiziert (s.o.).

- 30 "Ungefähr" meint im Rahmen dieser Erfindung im Zusammenhang mit Zahlen- oder Größenangaben einen Zahlen- oder Größenbereich um den angegebenen Zahlen- oder Größenwert herum. Im allgemeinen meint der Begriff ungefähr einen Bereich von jeweils 20% des angegebenen Wertes nach oben und nach unten.

- 35 "Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen
- 40 Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

"Pflanze" umfaßt alle einjährigen und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen

- 5 Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium,
- 10 Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panieum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browaalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.

15

Der Begriff "Pflanze" umfaßt bevorzugt monokotyledone Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis, Sorghum oder Hafer sowie Zuckerrohr.

20

Ferner umfaßt der Begriff dikotyledonen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

- 25 - Brassicaceae wie Raps, Rübsen, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten,
- Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuß
- 30 - Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika,
- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula,
- 35 - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini,

sowie Lein (Flachs), Baumwolle, Hanf, Klee, Spinat, Roter Pfeffer, Möhre, Karotte, Rübe, Rettich, Zuckerrübe, Süßkartoffel, Gurke, Chicorée, Blumenkohl, Brokkoli, Spargel,

40 Zwiebel, Knoblauch, Sellerie, Erdbeere, Himbeere, Brombeere, Ananas, Avocado, und den verschiedenen Baum-, Strauch-, Nuß- und Weinarten. Baumarten umfaßt bevorzugt Pflaume, Kirsche, Pfirsich, Nektarine, Aprikose, Banane, Papaya, Mango, Apfel,

Birne, Quitte.

Im Rahmen der Erfindung sind solche Pflanzen bevorzugt, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen, ganz besonders
5 bevorzugt monokotyledone Gattungen und Arten mit landwirtschaftlicher Bedeutung wie Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr.

10 Der Begriff "Stressfaktor" umfaßt im Rahmen der vorliegenden Erfindung biotische Stressfaktoren (wie insbesondere die unten aufgeführten Pathogene) sowie abiotische Stressfaktoren. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend sind als abiotische Stressfaktoren zu nennen: Chemischer Stress (z.B. durch Agrar-
15 und/oder Umweltchemikalien), US-Bestrahlung, Hitze, Kälte, Wassermangel, erhöhte Feuchtigkeit.

"Stressresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von Symptomen einer Pflanze infolge von Stress. Die Symptome können
20 vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

25 "Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch mindestens ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu
30 einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

35 "Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Stress- oder Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße
40 Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Stress- oder Pathogenart etc.) eine erhöhte Resistenz gegen ein und mehrere Stressfaktoren bzw. Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten

Ausprägung der Stress- oder Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die Pflanze oder pflanzliche Zellen oder die

- 5 Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfaßt. Dabei sind die Stress- oder Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 % vermindert.

10

"Auswahl" meint in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens einen Stressfaktor oder Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren, die eine zur Erkennung einer

15 vorliegenden oder erhöhten Stress- bzw. Pathogenresistenz geeignet sind. Dies können beispielsweise Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Nekrosen-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des

20 Ertrages, die Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel usw. betreffen.

15

20

"Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Viren oder Viroide, Bakterien, Pilze,

25 tierische Schädlinge, wie beispielsweise Insekten oder Nematoden. Besonders bevorzugt sind Pilze, insbesondere nekrotrophe oder hemibiotrophe Pilze. Es ist jedoch anzunehmen, dass die mesophyll-spezifische Expression eines BII-Proteins auch eine Resistenz gegen weitere Pathogene bewirkt, da

30 insgesamt eine Resistenz gegen Streßfaktoren erzeugt wird.

30

Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende Pathogene zu nennen:

- 35 1. Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene:

Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoramycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten,

40 Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti). Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 bis 4 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen. Folgende

40

englische und deutsche Termini können alternativ verwendet werden:

- 5 Ährenfäule - ear rot / head blight
 Stengelfäule - stalk rot
 Wurzelfäule - root rot
 Rost - rust
 Falscher Mehltau downy mildew

- 10 Weiter Übersetzungen können beispielsweise bei <http://www.bba.de/english/database/psmengl/pilz.htm> gefunden werden.

15 Tabelle 1: Erkrankungen hervorgerufen durch biotrophe, phytopathogene Pilze

Erkrankung	Pathogen
Braunrost	<i>Puccinia recondita</i>
Gelbrost	<i>P. striiformis</i>
Echter Mehltau	<i>Erysiphe graminis</i> / <i>Blumeria graminis</i>
Rost (gemeiner Mais)	<i>Puccinia sorghi</i>
Rost (südlicher Mais)	<i>Puccinia polysora</i>
Tabak Blattflecken	<i>Cercospora nicotianae</i>
Rost (tropischer Mais)	<i>Physopella pallescens</i> , <i>P. zeae</i> = <i>Angiopsora zeae</i>

20 Tabelle 2: Erkrankungen hervorgerufen durch nekrotrophe und/oder hemibiotrophe Pilze und Oomyceten

Erkrankung	Pathogen
Spelzenbräune	<i>Septoria</i> (<i>Stagonospora</i>) <i>nodorum</i>
Blattdürre	<i>Septoria tritici</i>
Ährenfusariosen	<i>Fusarium</i> spp.
Halmbruchkrankheit	<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>
Flugbrand	<i>Ustilago</i> spp.
Kraut- und Knollenfäule	<i>Phytophthora infestans</i>
Weizensteinbrand	<i>Tilletia caries</i>
Schwarzbeinigkeit	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
Anthracnose leaf blight	<i>Colletotrichum graminicola</i>
Anthracnose stalk rot	(teleomorph: <i>Glomerella graminicola</i> <i>Politis</i>); <i>Glomerella tucumanensis</i>

Erkrankung	Pathogen
	(anamorph: <i>Glomerella falcatum</i> Went)
Aspergillus ear and kernel rot	<i>Aspergillus flavus</i>
Banded leaf and sheath spot ("Wurzelötter")	<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn = <i>Rhizoctonia microsclerotia</i> J. Matz (telomorph: <i>Thanatephorus cucumeris</i>)
Black bundle disease	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams = <i>Cephalosporium acremonium</i> Auct. non Corda
Black kernel rot	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> = <i>Botryodiplodia theobromae</i>
Borde blanco	<i>Marasmiellus</i> sp.
Brown spot (black spot, stalk rot)	<i>Physoderma maydis</i>
<i>Cephalosporium</i> kernel rot	<i>Acremonium strictum</i> = <i>Cephalosporium acremonium</i>
Charcoal rot	<i>Macrophomina phaseolina</i>
<i>Corticium</i> ear rot	<i>Thanatephorus cucumeris</i> = <i>Corticium sasakii</i>
<i>Curvularia</i> leaf spot	<i>Curvularia clavata</i> , <i>C. eragrostidis</i> , = <i>C. maculans</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus eragrostidis</i>), <i>Curvularia inaequalis</i> , <i>C. intermedia</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus intermedius</i>), <i>Curvularia lunata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus lunatus</i>), <i>Curvularia pallescens</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus pallescens</i>), <i>Curvularia senegalensis</i> , <i>C. tuberculata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus tuberculatus</i>)
<i>Didymella</i> leaf spot	<i>Didymella exitalis</i>
<i>Diplodia</i> Ähren- und Stengelfäule	<i>Diplodia frumenti</i> (teleomorph: <i>Botryosphaeria festucae</i>)
<i>Diplodia</i> Ähren- und Stengelfäule, seed rot and seedling blight	<i>Diplodia maydis</i> = <i>Stenocarpella maydis</i>
<i>Diplodia</i> leaf spot or streak	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodia leaf macrospora</i>
Brown stripe downy mildew	<i>Sclerophthora rayssiae</i> var. <i>zeae</i>
Crazy top downy mildew	<i>Sclerophthora macrospora</i> = <i>Sclerospora macrospora</i>

Erkrankung	Pathogen
Green ear downy mildew (graminicola downy mildew)	Sclerospora graminicola
Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	Nigrospora oryzae (teleomorph: Khuskia oryzae)
Ährenfäulen (minor)	Alternaria alternata = A. tenuis, Aspergillus glaucus, A. niger, Aspergillus spp., Botrytis cinerea (teleomorph: Botryotinia fuckeliana), Cunninghamella sp., Curvularia pallescens, Doratomyces stemonitis = Cephalotrichum stemonitis, Fusarium culmorum, Gonatobotrys simplex, Pithomyces maydis, Rhizopus microsporus Tiegh., R. stolonifer = R. nigricans, Scopulariopsis brumptii
Ergot (horse's tooth)	Claviceps gigantea (anamorph: Sphacelia sp.)
Eyespot	Aureobasidium zeae = Kabatiella zeae
Fusarium Ähren- und Stengelfäule	Fusarium subglutinans = F. moniliforme var. subglutinans
Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	Fusarium moniliforme (teleomorph: Gibberella fujikuroi)
Fusarium Stengelfäule, seedling root rot	Fusarium avenaceum (teleomorph: Gibberella avenacea)
Gibberella Ähren- u. Stengelfäule	Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum)
Graue Ährenfäule	Botryosphaeria zeae = Physalospora zeae (anamorph: Macrophoma zeae)
Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeae-maydis
Helminthosporium root rot	Exserohilum pedicellatum = Helminthosporium pedicellatum (teleomorph: Setosphaeria pedicellata)
Hormodendrum Ährenfäule (Cladosporium Fäule)	Cladosporium cladosporioides = Hormodendrum cladosporioides, C. herbarum (teleomorph: Mycosphaerella tassiana)
Leaf spots, minor	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victoriae =

Erkrankung	Pathogen
	Helminthosporium victoriae (teleomorph: Cochliobolus victoriae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata) Graphium penicilliioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiosphaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zeae, S. zeicola, S. zeina
Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum)
Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum)
Penicillium Ährenfäule (blue eye, blue mold)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum
Phaeocytostroma Stengel- und Wurzelfäule	Phaeocytostroma ambiguum, = Phaeocytosporella zeae
Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
Physalospora Ährenfäule (Botryosphaeria Ährenfäule)	Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)
Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
Pyrenochaeta Stengel- und Wurzelfäule	Phoma terrestris = Pyrenochaeta terrestris
Pythium Wurzelfäule	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
Pythium Stengelfäule	Pythium aphanidermatum = P. butleri L.
Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	Epicoccum nigrum
Rhizoctonia Ährenfäule (sclerotial rot)	Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata)
Rhizoctonia Wurzel- und Stengelfäule	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae
Wurzelfäulen (minor)	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictyochoeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph:

Erkrankung	Pathogen
	Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = Helminthosporium rostratum)
Falscher Java Mehltau	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
Falscher Philippinen Mehltau	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
Falscher Sorghum Mehltau	Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi
Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
Falscher Zuckerrohr-Mehltau	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari
Sclerotium Ährenfäule (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
Seed rot-seedling blight	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicellatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zeae (anamorph: F. graminearum), Macrophomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zeae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
Selenophoma leaf spot	Selenophoma sp.
Sheath rot	Gaeumannomyces graminis
Shuck rot	Myrothecium gramineum
Silage mold	Monascus purpureus, M. ruber
Flugbrand (Smut, common)	Ustilago zeae = U. maydis
Smut, false	Ustilaginoidea virens
Kolbenbrand	Sphacelotheca reiliana =

Erkrankung	Pathogen
(Smut, head)	Sporisorium holcisorghi
Southern corn leaf blight and stalk rot	Cochliobolus heterostrophus (anamorph: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis)
Southern leaf spot	Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora
Stengelfäulen (minor)	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematococca), F. tricinatum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopoglyphus zeae, Spicaria sp.
Lagerfäulen (Storage rots)	Aspergillus spp., Penicillium spp. und weitere Pilze
Tar spot	Phyllachora maydis
Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocrea sp.
White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zeae
Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-maydis)
Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

Tabelle 4: Erkrankungen hervorgerufen durch Pilze und Oomyceten mit unklarer Einstufung hinsichtlich biotrophen, hemibiotrophen bzw. nekrotrophen Verhaltens

5

Erkrankung	Pathogen
Hyalothyridium leaf spot	Hyalothyridium maydis
Late wilt	Cephalosporium maydis

Besonders bevorzugt sind

- 10
- Plasmodiophoromycota wie Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie), Spongospora subterranea, Polymyxa graminis,
 - Oomycota wie Bremia lactucae (Falscher Mehltau an Salat), Peronospora (Falscher Mehltau) bei Löwenmaul (P. antirrhini), Zwiebel (P. destructor), Spinat (P.

- effusa), Sojabohne (*P. manchurica*), Tabak (Blauschimmel; *P. tabacina*) Alfalfa und Klee (*P. trifolium*), *Pseudoperonospora humuli* (Falscher Mehltau an Hopfen), *Plasmopara* (Falscher Mehltau bei Trauben) (*P. viticola*) und Sonnenblume (*P. halstedii*), *Sclerophthora macrospora* (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gäsern), *Pythium* (z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch *P. debaryanum*), *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), *Albugo spec.*
- 10 - Ascomycota wie *Microdochium nivale* (Schneeschiimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule v.a. bei Weizen), *Fusarium oxysporum* (*Fusarium*-Welke an Tomate), *Blumeria graminis* (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. *hordei*) und Weizen (f.sp. *tritici*)), *Erysiphe pisi* (Erbsenmehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Unicnula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea*, *Pyrenophora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).
- 20 - Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (*Typhula*-Fäule an Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzeltöter an Kartoffeln), *Sphacelotheca spp.* (Kolbenbrand bei Sorghum), *Melampsora lini* (Rost bei Flachs), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* (Gelbrost an Weizen, Gerste, Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (Wurzel- und Stengelfäule bei zahlreichen Pflanzen).

- Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie Septoria (Stagonospora) nodorum (Spelzenbräune) an Weizen (Septoria tritici), Pseudocercospora herpotrichoides (Halmbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen),
 5 Rynchosporium secalis (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), Alternaria solani (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), Phoma betae (Wurzelbrand an Beta-Rübe), Cercospora beticola (Cercospora-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (Alternaria brassicae (Rapsschwärze an Raps,
 10 Kohl u.a. Kreuzblütlern), Verticillium dahliae (Rapswelke und -stengelfäule), Colletotrichum lindemuthianum (Brennfleckenkrankheit an Bohne), Phoma lingam - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), Botrytis cinerea (Grauschimmel an
 15 Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).

- Am meisten bevorzugt sind Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), Microdochium nivale (vormals Fusarium nivale; Schneeschimmel an Roggen und Weizen),
 20 Fusarium graminearum, Fusarium culmorum, Fusarium avenaceum und Fusarium poae (Ährenfäule an Weizen), Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Magnaporthe grisea (rice blast disease), Sclerotinia sclerotium (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), Septoria (Stagonospora) nodorum und Septoria tritici
 25 (Spelzenbräune an Weizen), Alternaria brassicae (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), Phoma lingam (Umfallkrankheit, Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

30 2. Bakterielle Pathogene:

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 5 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

35

Tabelle 5: Bakterielle Erkrankungen

Erkrankung	Pathogen
Bacterial leaf blight and stalk rot	Pseudomonas avenae subsp. avenae
Bacterial leaf spot	Xanthomonas campestris pv. holcicola
Bakterielle Stengelfäule	Enterobacter dissolvens = Erwinia dissolvens
Schwarzbeinigkeit	Erwinia carotovora subsp.

Erkrankung	Pathogen
("Bacterial stalk and top rot")	carotovora, Erwinia chrysanthemi pv. zeae
Bacterial stripe	Pseudomonas andropogonis
Chocolate spot	Pseudomonas syringae pv. coronafaciens
Goss's bacterial wilt and blight (leaf freckles and wilt)	Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis = Corynebacterium michiganense pv. andnebraskense
Holcus spot	Pseudomonas syringae pv. syringae
Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria
Seed rot-seedling blight	Bacillus subtilis
Stewart's disease (bacterial wilt)	Pantoea stewartii = Erwinia stewartii
Corn stunt (achapparramiento, maize stunt, Mesa Central or Rio Grande maize stunt)	Spiroplasma kunkelii

Ganz besonders bevorzugt sind nachfolgende pathogene Bakterien:

- Corynebacterium sepedonicum (Bakterienringfäule an Kartoffel),
 Erwinia carotovora (Schwarzbeinigkeit an Kartoffel), Erwinia
 5 amylovora (Feuerbrand an Birne, Apfel, Quitte), Streptomyces
 scabies (Kartoffelschorf), Pseudomonas syringae pv. tabaci
 (Wildfeuer an Tabak), Pseudomonas syringae pv. phaseolicola
 (Fettfleckenkrankheit an Buschbohne), Pseudomonas syringae pv.
 tomato ("bacterial speck" an Tomate), Xanthomonas campestris pv.
 10 malvacearum (Blattfleckenkrankheit an Baumwolle) und Xanthomonas
 campestris pv. oryzae (Bakterienfäule an Reis und anderen
 Gräsern).

3. Virale Pathogene:

- 15 "Virale Pathogene" schließt sämtliche Pflanzenviren ein
 wie beispielsweise Tabak- oder oder Cucumber-Mosaic Virus,
 Ringspot-Virus, Nekrose-Virus, Mais Dwarf-Mosaic Virus etc.
- 20 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend sind die in Tabelle 6
 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten
 Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 6: Virale Erkrankungen

Krankheit	Pathogen
American wheat striate (wheat striate mosaic)	American wheat striate mosaic virus (AWSMV)
Barley stripe mosaic	Barley stripe mosaic virus (BSMV)
Barley yellow dwarf	Barley yellow dwarf virus (BYDV)
Brome mosaic	Brome mosaic virus (BMV)
Cereal chlorotic mottle	Cereal chlorotic mottle virus (CCMV)
Corn chlorotic vein banding (Brazilian maize mosaic)	Corn chlorotic vein banding virus (CCVBV)
Corn lethal necrosis	Viruskomplex aus Maize chlorotic mottle virus (MCMV) und Maize dwarf mosaic virus (MDMV) A oder B oder Wheat streak mosaic virus (WSMV)
Cucumber mosaic	Cucumber mosaic virus (CMV)
Cynodon chlorotic streak	Cynodon chlorotic streak virus (CCSV)
Johnsongrass mosaic	Johnsongrass mosaic virus (JGMV)
Maize bushy stunt	Mycoplasma-like organism (MLO) associated
Maize chlorotic dwarf	Maize chlorotic dwarf virus (MCDV)
Maize chlorotic mottle	Maize chlorotic mottle virus (MCMV)
Maize dwarf mosaic	Maize dwarf mosaic virus (MDMV) strains A, D, E and F
Maize leaf fleck	Maize leaf fleck virus (MLFV)
Maize line	Maize line virus (MLV)
Maize mosaic (corn leaf stripe, enanismo rayado)	Maize mosaic virus (MMV)
Maize mottle and chlorotic stunt	Maize mottle and chlorotic stunt virus
Maize pellucid ringspot	Maize pellucid ringspot virus (MPRV)
Maize raya gruesa	Maize raya gruesa virus (MRGV)
maize rayado fino (fine striping disease)	Maize rayado fino virus (MRFV)
Maize red leaf and red stripe	Mollicute
Maize red stripe	Maize red stripe virus (MRSV)
Maize ring mottle	Maize ring mottle virus (MRMV)
Maize rio IV	Maize rio cuarto virus (MRCV)
Maize rough dwarf (nanismo ruvido)	Maize rough dwarf virus (MRDV) (Cereal tillering disease virus)

Krankheit	Pathogen
Maize sterile stunt	Maize sterile stunt virus (strains of barley yellow striate virus)
Maize streak	Maize streak virus (MSV)
Maize stripe (maize chlorotic stripe, maize hoja blanca)	Maize stripe virus
Maize stunting	Maize stunting virus
Maize tassel abortion	Maize tassel abortion virus (MTAV)
Maize vein enation	Maize vein enation virus (MVEV)
Maize wallaby ear	Maize wallaby ear virus (MWEV)
Maize white leaf	Maize white leaf virus
Maize white line mosaic	Maize white line mosaic virus (MWLMV)
Millet red leaf	Millet red leaf virus (MRLV)
Northern cereal mosaic	Northern cereal mosaic virus (NCMV)
Oat pseudorosette (zakuklivanie)	Oat pseudorosette virus
Oat sterile dwarf	Oat sterile dwarf virus (OSDV)
Rice black-streaked dwarf	Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV)
Rice stripe	Rice stripe virus (RSV)
Sorghum mosaic	Sorghum mosaic virus (SrMV) (auch: sugarcane mosaic virus (SCMV) Stämme H, I and M)
Sugarcane Fiji disease	Sugarcane Fiji disease virus (FDV)
Sugarcane mosaic	Sugarcane mosaic virus (SCMV) strains A, B, D, E, SC, BC, Sabi and MB (formerly MDMV-B)
Wheat spot mosaic	Wheat spot mosaic virus (WSMV)

4. Tierische Schädlinge

4.1 Insekten Pathogene:

5

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien Insekten wie beispielsweise Käfer, Raupen, Läuse oder Milben zu nennen. Bevorzugt sind Insekten der Gattungen Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc.. Besonders bevorzugt sind Coleoptera and Lepidoptera Insekten, wie beispielsweise den Maiszünsler (European Corn Borer), *Diabrotica barberi*,

10

21

Diabrotica undecimpunctata, Diabrotica virgifera, Agrotis
 epsilon, Crymodes devastator, Feltia ducens, Agrotis gladiaria,
 Melanotus spp., Aeolus mellillus, Aeolus mancus, Horistonotus
 uhlerii, Sphenophorus maidis, Sphenophorus zeae, Sphenophorus
 5 parvulus, Sphenophorus callosus, Phyllogphaga spp., Anuraphis
 maidiradicis, Delia platura, Colaspis brunnea, Stenolophus
 lecontei und Clivinia impressifrons.

10 Ferner sind zu nennen: Das Getreidehähnchen (Oulema melanopus),
 die Fritfliege (Oscinella frit), Drahtwürmer (Agrotis lineatus)
 und Blattläuse (wie z.B. Haferblattlaus Rhopalosiphum padi,
 Grosse Getreideblattlaus Sitobion avenae).

4.2 Nematoden:

15

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 7
 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten
 Erkrankungen zu nennen.

20

Tabelle 7: Parasitäre Nematoden

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	Dolichodorus spp., D. heterocephalus
Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen	Ditylenchus dipsaci
Burrowing	Radopholus similis
Haferzystenälchen	Heterodera avenae, H. zeae, Punctodera chalcensis
Dagger	Xiphinema spp., X. americanum, X. mediterraneum
False root-knot	Nacobbus dorsalis
Lance, Columbia	Hoplolaimus columbus
Lance	Hoplolaimus spp., H. galeatus
Lesion	Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. zeae
Needle	Longidorus spp., L. breviannulatus
Ring	Criconemella spp., C. ornata
Wurzelgallenälchen	Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica
Spiral	Helicotylenchus spp.
Sting	Belonolaimus spp., B. longicaudatus

Schädigung	Pathogene Nematode
Stubby-root	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.
Stunt	Tylenchorhynchus dubius

Ganz besonders bevorzugt sind Globodera rostochiensis und G. pallida (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), Heterodera schachtii (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), Heterodera avenae (Haferzystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), Ditylenchus dipsaci (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), Anguina tritici (Weizenälchen, Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), Meloidogyne hapla (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel, Zuckerrübe, Luzerne).

Als für die einzelnen Sorten bevorzugte Pilz- oder Virus-Pathogene sind beispielsweise zu nennen:

1. Gerste:

Pilz-, bakterielle und virale Pathogene: Puccinia graminis f.sp. hordei, Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. hordei, barley yellow dwarf virus (BYDV),

Pathogene Insekten / Nematoden: Ostrinia nubilalis (European corn borer); Agrotis ipsilon; Schizaphis graminum; Blissus leucopterus leucopterus; Acrosternum hilare; Euschistus servus; Delia platura; Mayetiola destructor; Petrobia latens.

2. Sojabohne:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Phytophthora megasperma f.sp. glycinea, Macrophomina phaseolina, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum, Fusarium oxysporum, Diaporthe phaseolorum var. sojae (Phomopsis sojae), Diaporthe phaseolorum var. caulivora, Sclerotium rolfsii, Cercospora kikuchii, Cercospora sojae, Peronospora manshurica, Colletotrichum dematium (Colletotrichum truncatum), Corynespora cassiicola, Septoria glycines, Phyllosticta sojicola, Alternaria alternata, Pseudomonas syringae p.v. glycinea, Xanthomonas campestris p.v. phaseoli, Microsphaera diffusa, Fusarium semitectum,

Phialophora gregata, Sojabohnen Mosaikvirus, Glomerella
glycines, Tobacco Ring spot virus, Tobacco Streak virus,
Phakopsorapachyrhizi, Pythium aphanidermatum, Pythium ultimum,
Pythium debaryanum, Tomato spotted wilt virus, Heterodera
5 glycines Fusarium solani.

Pathogene Insekten / Nematoden: Pseudoplusia includens;
Anticarsia gemmatilis; Plathypena scabra; Ostrinia nubilalis;
Agrotis ipsilon; Spodoptera exigua; Heliothis virescens;
10 Helicoverpa zea; Epilachna varivestis; Myzus persicae; Empoasca
fabae; Acrosternum hilare; Melanoplus femurrubrum; Melanoplus
differentialis; Hylemya platura; Sericothrips variabilis; Thrips
tabaci; Tetranychus turkestani; Tetranychus urticae;

15 3. Raps:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Albugo candida,
Alternaria brassicae, Leptosphaeria maculans, Rhizoctonia
solani, Sclerotinia sclerotiorum, Mycosphaerella brassicicola,
20 Pythium ultimum, Peronospora parasitica, Fusarium roseum,
Alternaria alternata.

4. Alfalfa:

25 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Clavibacter
michiganense subsp. insidiosum, Pythium ultimum, Pythium
irregulare, Pythium splendens, Pythium debaryanum, Pythium
aphanidermatum, Phytophthora megasperma, Peronospora
trifoliorum, Phoma medicaginis var. medicaginis, Cercospora
30 medicaginis, Pseudopeziza medicaginis, Leptotrochila
medicaginis, Fusarium, Xanthomonas campestris p.v. alfalfae,
Aphanomyces euteiches, Stemphylium herbarum, Stemphylium
alfalfae.

35 5. Weizen:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Pseudomonas syringae
p.v. atrofaciens, Urocystis agropyri, Xanthomonas campestris
p.v. translucens, Pseudomonas syringae p.v. syringae, Alternaria
40 alternata, Cladosporium herbarum, Fusarium graminearum, Fusarium
avenaceum, Fusarium culmorum, Ustilago tritici, Ascochyta
tritici, Cephalosporium gramineum, Collotetrachium graminicola,
Erysiphe graminis f.sp. tritici, Puccinia graminis f.sp.
tritici, Puccinia recondita f.sp. tritici, Puccinia striiformis,

- Pyrenophora tritici-repentis, Septoria (Stagonospora) nodorum, Septoria tritici, Septoria avenae, Pseudocercospora herpotrichoides, Rhizoctonia solani, Rhizoctonia cerealis, Gaeumannomyces graminis var. tritici, Pythium aphanidermatum, 5 Pythium arrhenomanes, Pythium ultimum, Bipolaris sorokiniana, Barley Yellow Dwarf Virus, Brome Mosaic Virus, Soil Borne Wheat Mosaic Virus, Wheat Streak Mosaic Virus, Wheat Spindle Streak Virus, American Wheat Striate Virus, Claviceps purpurea, Tilletia tritici, Tilletia laevis, Ustilago tritici, Tilletia 10 indica, Rhizoctonia solani, Pythium arrhenomanes, Pythium graminicola, Pythium aphanidermatum, High Plains Virus, European Wheat Striate Virus, Puccinia graminis f.sp. tritici (Wheat stem rust), Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. tritici (Wheat Powdery Mildew)

15

- Pathogene Insekten / Nematoden: Pseudaletia unipunctata; Spodoptera frugiperda; Elasmopalpus lignosellus; Agrotis orthogonia; Elasmopalpus lignosellus; Oulema melanopus; Hypera punctata; Diabrotica undecimpunctata howardi; Russian wheat 20 aphid; Schizaphis graminum; Macrosiphum avenae; Melanoplus femurrubrum; Melanoplus differentialis; Melanoplus sanguinipes; Mayetiola destructor; Sitodiplosis mosellana; Meromyza americana; Hylemya coarctata; Frankliniella fusca; Cephus cinctus; Aceria tulipae;

25

6. Sonnenblume:

- Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Plasmophora halstedii, Sclerotinia sclerotiorum, Aster Yellows, Septoria helianthi, 30 Phomopsis helianthi, Alternaria helianthi, Alternaria zinniae, Botrytis cinerea, Phoma macdonaldii, Macrophomina phaseolina, Erysiphe cichoracearum, Rhizopus oryzae, Rhizopus arrhizus, Rhizopus stolonifer, Puccinia helianthi, Verticillium dahliae, Erwinia carotovorum p.v. Carotovora, Cephalosporium acremonium, 35 Phytophthora cryptogea, Albugo tragopogonis.

40

- Pathogene Insekten / Nematoden: Suleima helianthana; Homoeosoma electellum; zygogramma exclamationis; Bothyrus gibbosus; Neolasioptera murtfeldtiana;

7. Mais:

- Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Fusarium moniliforme var. subglutinans, Erwinia stewartii, Fusarium moniliforme,

25

- Gibberella zeae (*Fusarium graminearum*), *Stenocarpella maydi* (*Diplodia maydis*), *Pythium irregulare*, *Pythium debaryanum*, *Pythium graminicola*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris maydis* 0, T
- 5 (*Cochliobolus heterostrophus*), *Helminthosporium carbonum* I, II & III (*Cochliobolus carbonum*), *Exserohilum turcicum* I, II & III, *Helminthosporium pedicellatum*, *Physoderma maydis*, *Phyllosticta maydis*, *Kabatiella maydis*, *Cercospora sorghi*, *Ustilago maydis*, *Puccinia sorghi*, *Puccinia polysora*, *Macrophomina phaseolina*,
- 10 *Penicillium oxalicum*, *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Curvularia inaequalis*, *Curvularia pallescens*, *Clavibacter michiganense* subsp. *nebraskense*, *Trichoderma viride*, Maize Dwarf Mosaic Virus A & B, Wheat Streak Mosaic Virus, Maize Chlorotic Dwarf Virus, *Claviceps sorghi*, *Pseudonomas avenae*,
- 15 *Erwinia chrysanthemi* p.v. *Zea*, *Erwinia corotovora*, Cornstunt spiroplasma, *Diplodia macrospora*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinesis*, *Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*, *Spacelotheca reiliana*, *Physopella zeae*, *Cephalosporium maydis*,
- 20 *Cephalosporium acremonium*, Maize Chlorotic Mottle Virus, High Plains Virus, Maize Mosaic Virus, Maize Rayado Fino Virus, Maize Streak Virus (MSV, Maisstrichel-Virus), Maize Stripe Virus, Maize Rough Dwarf Virus.
- 25 Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis*; *Agrotis ipsilon*; *Helicoverpa zea*; *Spodoptera frugiperda*; *Diatraea grandiosella*; *Elasmopalpus lignosellus*; *Diatraea saccharalis*; *Diabrotica virgifera*; *Diabrotica longicornis barberi*; *Diabrotica undecimpunctata howardi*; *Melanotus* spp.; *Cyclocephala borealis*;
- 30 *Cyclocephala immaculata*; *Popillia japonica*; *Chaetocnema pulicaria*; *Sphenophorus maidis*; *Rhopalosiphum maidis*; *Anuraphis maidiradicis*; *Blissus leucopterus leucopterus*; *Melanoplus femurrubrum*; *Melanoplus sanguinipes*; *Hylemya platyura*; *Agromyza parvicornis*; *Anaphothrips obscurus*; *Solenopsis milesta*;
- 35 *Tetranychus urticae*.
8. Sorghum:
- Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Exserohilum turcicum*,
- 40 *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*), *Cercospora sorghi*, *Gloeocercospora sorghi*, *Ascochyta sorghina*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Xanthomonas campestris* p.v. *holcicola*, *Pseudomonas andropogonis*, *Puccinia purpurea*, *Macrophomina phaseolina*, *Perconia circinata*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria*

- alternate, *Bipolaris sorghicola*, *Helminthosporium sorghicola*,
Curvularia lunata, *Phoma insidiosa*, *Pseudomonas avenae*
(*Pseudomonas alboprecipitans*), *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora*
sorghicola, *Phyllachara sacchari*, *Sporisorium reilianum*
5 (*Sphacelotheca reiliana*), *Sphacelotheca cruenta*, *Sporisorium*
sorghii, Sugarcane mosaic H, Maize Dwarf Mosaic Virus A & B,
Claviceps sorghi, *Rhizoctonia solani*, *Acremonium strictum*,
Sclerophthora macrospora, *Peronosclerospora sorghi*,
Peronosclerospora philippinensis, *Sclerospora graminicola*,
10 *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium arrhenomanes*,
Pythium graminicola.

- Pathogene Insekten / Nematoden: *Chilo partellus*; *Spodoptera*
frugiperda; *Helicoverpa zea*; *Elasmopalpus lignosellus*; *Feltia*
15 *subterranea*; *Phyllophaga crinita*; *Eleodes*, *Conoderus* und *Aeolus*
spp.; *Oulema melanopus*; *Chaetocnema pulicaria*; *Sphenophorus*
maidis; *Rhopalosiphum maidis*; *Siphaflava*; *Blissus leucopterus*
leucopterus; *Contarinia sorghicola*; *Tetranychus cinnabarinus*;
Tetranychus urticae.

20

9. Baumwolle:

- Pathogene Insekten / Nematoden: *Heliothis virescens*; *Helicoverpa*
zea; *Spodoptera exigua*; *Pectinophora gossypiella*; *Anthonomus*
25 *grandis grandis*; *Aphis gossypii*; *Pseudatomoscelis seriatus*;
Trialeurodes abutilonea; *Lygus lineolaris*; *Melanoplus*
femurrubrum; *Melanoplus differentialis*; *Thrips tabaci* (onion
thrips); *Frankliniella fusca*; *Tetranychus cinnabarinus*;
Tetranychus urticae;

30

10. Reis:

- Pathogene Insekten / Nematoden: *Diatraea saccharalis*; *Spodoptera*
frugiperda; *Helicoverpa zea*; *Colaspis brunnea*; *Lissorhoptrus*
35 *oryzophilus*; *Sitophilus oryzae*; *Nephotettix nigropictus*; *Blissus*
leucopterus leucopterus; *Acrosternum hilare*.

11. Raps:

- 40 Pathogene Insekten / Nematoden: *Brevicoryne brassicae*;
Phylotreta cruciferae; *Mamestra conjugata*; *Plutella*
xylostella; *Delia ssp.*.

"BI1-Protein" meint im Rahmen der Erfindung Polypeptide die mindestens eine Sequenz die eine Homologie von mindestens 50%, bevorzugt mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90%, ganz besonders bevorzugt 100% aufweisen zu einem BI1-Konsensusmotiv ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) H(L/I)KXVY
- b) AXGA(Y/F)XH
- c) NIGG
- 10 d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR
- e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL
- f) DP(S/G)(L/I)(I/L)
- g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T)
- h) YL(Y/F)LGG, bevorzugt EYLYLGG
- 15 i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W
- j) DTGX(I/V)(I/V)E

Besonders bevorzugt ist dabei das BI- Konsensusmotiv f) YL(Y/F)LGG, ganz besonders bevorzugt (EYLYLGG). Dieses Motiv ist charakteristisch für pflanzliche BI1-Proteine.

Besonders bevorzugt kommen Sequenzen mit Homologie zu mindestens 2 oder 3 dieser Motive (a bis g) in einem BI1-Protein vor, ganz besonders bevorzugt mindestens 4 oder 5, am meisten bevorzugt alle Motive a bis j. Weitere BI1 typischen Sequenzmotive kann der Fachmann unschwer aus dem Sequenzvergleich von BI1-Proteine - wie in Fig. 1 oder 6 dargestellt - ableiten.

Insbesondere bevorzugt sind BI-Proteine, die kodiert werden durch ein Polypeptid das mindestens eine Sequenz umfaßt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 und 32, und
- 35 b) Sequenzen, die eine Identität von mindestens 50%, bevorzugt mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 90%, ganz besonders bevorzugt mindestens 95% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 und 32 aufweisen,
- 40 c) Sequenzen die mindestens eine Teilsequenz von mindestens 10, bevorzugt 20, besonders bevorzugt 50 zusammenhängenden Aminosäureresten einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4,

6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 und 32 umfassen.

- Erfindungsgemäß von dem Begriff BI-Protein umfaßt sind
- 5 insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der BI1-Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 und 10 sowie homologe Polypeptide aus anderen Organismen, bevorzugt Pflanzen, welche weiterhin im wesentlichen gleiche Eigenschaften aufweisen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen,
- 10 Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste. Umfaßt sind insofern auch Ausführungsformen unter Verwendung von BI1-Proteinen aus nicht-pflanzlichen Organismen wie beispielsweise Mensch (GenBank Acc.-No.: P55061), Ratte (GenBank Acc.-No.: P55062) oder Drosophila (GenBank Acc.-No.: Q9VSH3).
- 15 Zwischen pflanzlichen und nicht-pflanzlichen BI1-Proteinen konservierte Motive können durch Sequenzvergleiche leicht identifiziert werden (vgl. Alignment in Bolduc et al. (2003) Planta 216:377-386; Fig. 1 und 6).
- 20 Somit werden beispielsweise auch solche Polypeptide durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation eines Polypeptides gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 und 10 erhält.
- Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten BI1-Sequenzen
- 25 homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen können z.B. durch
- a) Datenbanksuche in Banken von Organismen, deren genomische oder cDNA Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, unter Verwendung der bereitgestellten BI1-Sequenzen als Suchsequenz
- 30 oder
- b) Durchmustern von Gen- oder cDNA-Bibliotheken unter Verwendung der bereitgestellten BI1-Sequenzen als Sonde -
- 35 aufgefunden werden. Die Durchmusterung von cDNA- oder genomischen Bibliotheken (beispielsweise unter Verwendung einer der unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 und 31 beschriebene Nukleinsäuresequenzen oder Teilen derselben als Sonde), ist ein dem Fachmann geläufiges Verfahren,
- 40 um Homologe in anderen Arte zu identifizieren. Dabei haben die von den Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 und 31 abgeleiteten Sonden eine Länge von mindestens 20 bp, bevorzugt mindestens 50 bp, besonders bevorzugt mindestens 100 bp, ganz besonders

29

bevorzugt mindestens 200 bp, am meisten bevorzugt mindestens 400 bp. Für die Durchmusterung der Bibliotheken kann auch ein zu den unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 und 31 37 beschriebenen Sequenzen komplementärer DNA-Strang eingesetzt werden.

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 50	Length Weight: 3
Average Match: 10	Average Mismatch: 0

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 8	Length Weight: 2
Average Match: 2,912	Average Mismatch: -2,003

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

- BI1-Proteine umfassen auch solche Polypeptide die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 oder 31 beschriebenen
- 5 BI1 Nukleinsäuresequenz, der zu ihr komplementären Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vorgenannten hybridisieren und die gleichen wesentlichen Eigenschaften wie die unter SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 und 10 beschriebenen Proteine haben.
- 10 Der Begriff "Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57)
- 15 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben. Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit
- 20 geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0.2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7.0). Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr
- 25 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch
- 30 denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50% Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.
- 35 "Wesentliche Eigenschaften" meint in Bezug auf ein BI-Protein beispielsweise eine oder mehr nachfolgender Eigenschaften:
- a) Verleihung oder Steigerung der Pathogenresistenz gegen zumindest ein Pathogen bei Erhöhung Proteinmenge oder Funktion des besagten BI-Proteins in mindestens einem Gewebe
- 40 der Pflanze, wobei besagtes Gewebe nicht die Blattepidermis ist.
- b) Ausbleiben eines spontan-induzierten Zelltodes bei Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion des besagten BI-Proteins

c) Die Eigenschaft bei transienter co-Transfektion von Bax mit besagtem BI1-Protein beispielsweise in HEK293 Zellen die BAX-induzierte Apoptose signifikant zu inhibieren.
5 Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Bolduc N et al. (2003) Planta 216:377-386).

d) Das Vorliegen von fünf bis sieben putativen Transmembrandomänen innerhalb der besagten BI1-Proteins.
10

e) Eine präferentielle Lokalisation in Zellmembranen, insbesondere der Kernhüll-, ER- und/oder Thylakoidmembran.

Dabei kann die quantitative Ausprägung besagter Eigenschaften eines BI1-Proteins nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Wert erhalten für das BI1-Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 oder 10 abweichen.
15

Der Begriff "Erhöhung der BI1 Proteinmenge oder Funktion" ist im Rahmen dieser Erfindung breit zu verstehen und kann auf unterschiedlichen zellbiologischen Mechanismen beruhen.
20

"Proteinmenge" meint die Menge eines BI1-Proteins in dem jeweils angegebenen Organismus, Gewebe, Zelle oder Zellkompartiment.
25

"Erhöhung der Proteinmenge" meint die mengenmäßige Erhöhung der Menge eines BI1-Proteins in dem jeweils angegebenen Organismus, Gewebe, Zelle oder Zellkompartiment. - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, aber unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Die Erhöhung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 30 % oder mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 % oder 100 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 200 % oder 500 %, am meisten bevorzugt um mindestens 1000 %. Die Bestimmung der Proteinmenge kann durch verschiedene dem Fachmann geläufige Verfahren erfolgen. Beispielfhaft jedoch nicht einschränkend seien zu nennen: Das Mikro-Biuret Verfahren (Goa J (1953) Scand J Clin Lab Invest 5:218-222), die Folin-Ciocalteu-Methode (Lowry OH et al. (1951) J Biol Chem 193:265-275) oder die Messung der Adsorption von CBB G-250 (Bradford MM (1976) Analyt Biochem 72:248-254). Ferner kann eine Quantifizierung über immunologische Methoden wie beispielsweise Western-Blot
30
35
40

- erfolgen. Die Herstellung entsprechender BII-Antikörper sowie die Durchführung von BII-Western-Blots ist beschrieben (Bolduc et al. (2002) FEBS Lett 532:111-114). Eine indirekte Quantifizierung kann über Northern-Blots realisiert werden, wobei die mRNA Menge in der Regel gut mit der resultierenden Proteinmenge korreliert. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (u.a. Bolduc et al. (2003) Planta 216:377-386; Matsumura H et al. (2003) Plant J 33:425-434).
- 10 "Funktion" meint bevorzugt die Eigenschaft eines BII-Proteins den spontan-induzierten Zelltodes zu vermindern und/oder die Eigenschaft, die apoptose-induzierende Wirkung von Bax zu inhibieren. Entsprechende Funktionen zählen zu den wesentlichen Eigenschaften eines BII-Proteins.
- 15 "Erhöhung" der Funktion meint im Rahmen dieser Erfindung beispielsweise die mengenmäßige Steigerung der inhibitorischen Wirkung auf den Bax-induzierten apoptotischen Zelltod, welche durch dem Fachmann geläufige Verfahren quantifiziert werden kann
- 20 (s.o.) Der Erhöhung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 30 % oder mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 % oder 100 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 200 % oder 500 %, am meisten bevorzugt um mindestens 1000 %. Verfahren zur Erhöhung der Funktion umfassen neben den
- 25 oben beschriebenen Verfahren zur Erhöhung der Proteinmenge (die auch immer die Funktion erhöht) ferner beispielhaft - jedoch nicht einschränkend - insbesondere das Einführen von Mutationen in ein BII-Protein.
- 30 Die BII-Proteinmenge kann beispielhaft jedoch nicht einschränkend durch eines der nachfolgenden Verfahren erhöht werden:
- 35 a) Rekombinante Expression oder Überexpression eines BII-Proteins durch Einringen einer rekombinanten Expressionskassette umfassend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII-Protein unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.
- 40 b) Modifikation (z.B. Austausch) der regulatorischen Regionen (z.B. der Promotorregion) eines endogenen BII-Gens beispielsweise Austausch gegen einen gewebespezifischen Promotor mittels homologer Rekombination, wobei besagter

Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.

- 5 c) Insertion einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII-Protein in das pflanzliche Genom hinter einen gewebespezifischen Promotor mittels homologer Rekombination, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.
- 10 d) Erhöhung der Expression eines endogenen BII-Proteins durch Einbringen eines Transkriptionsfaktors (z.B. eines artifiziellen Transkriptionsfaktors aus der Klasse der Zinkfingerproteine) geeignet zur Induktion der Expression besagten BII-Proteins. Bevorzugt ist das Einringen einer
- 15 rekombinanten Expressionskassette umfassend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für besagten Transkriptionsfaktor unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.
- 20 Der Begriff "Einbringen" umfaßt im Rahmen der Erfindung allgemein alle Verfahren, die dazu geeignet die einzubringende Verbindung, direkt oder indirekt, in eine Pflanze oder eine
- 25 Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Samen derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfaßt. Die Einbringen kann zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz besagter Verbindung führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen) oder induzierbaren. Einführen umfaßt beispielsweise Verfahren wie
- 30 Transfektion, Transduktion oder Transformation.
- In den im Rahmen der Erfindung zum Einsatz kommenden rekombinanten Expressionskassetten steht ein Nukleinsäuremolekül (beispielsweise kodierend für ein BII-Protein) in funktioneller
- 35 Verknüpfung mit mindestens einem gewebespezifischen Promotor, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist d.h. natürlicherweise nicht mit derselben kombiniert vorkommt. Die
- 40 erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten können optional weitere genetische Kontrollelemente umfassen.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung des besagten Promotors mit der zu

- exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der rekombinanten Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht
- 5 unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen
- 10 die rekombinant zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der rekombinant zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als
- 15 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare. Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer rekombinanten Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert
- 20 werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY),
- 25 in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die
- 30 Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymchnittstellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen.
- 35 Bevorzugt kann die rekombinante Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom inseriert werden.
- 40 Unter einer rekombinanten Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen der Promoter - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - vor ein endogenes B11-Gen plaziert wird, und so die Expression des B11-Proteins

steuert. Analog kann auch die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz (z.B. kodierend für ein B11-Protein) derart hinter einen endogenen Promotor plaziert werden, dass der gleiche Effekt auftritt. Beide Ansätze führen zu

5 rekombinanten Expressionskassetten im Sinne der Erfindung.

Unter einem "gewebespezifischen Promotor, der im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist" sind im Rahmen dieser Erfindung allgemein solche Promotoren zu verstehen, die

10 geeignet sind eine rekombinante Expression einer Nukleinsäuresequenz mindestens in einem pflanzlichen Gewebe zu gewährleisten oder zu erhöhen, mit der Maßgabe, dass

- 15 a) besagtes pflanzliches Gewebe ausgewählt ist aus allen pflanzlichen Geweben mit Ausnahme der Blattepidermis, und
- b) die rekombinante Expression unter Kontrolle des besagten Promotors in besagtem pflanzlichen Gewebe mindestens das fünffache, bevorzugt mindestens das zehnfache, besonders
- 20 bevorzugt mindestens das einhundertfache der Expression in der pflanzlichen Blattepidermis beträgt.

Dem Fachmann sind zahlreiche Promotoren bekannt, die diesen Anforderungen genügen. Insbesondere geeignet sind

25 gewebespezifische Promotoren, wie beispielsweise, jedoch nicht einschränkend Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Blüten, Stengel, Wurzeln, Knollen oder Samen.

- 30 a) Als Samen spezifische Promotoren bevorzugt sind zum Beispiel die Promotoren des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol Gen Genet 215(2):326-331) und Legumin B4 (LeB4; Baumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet
- 35 225:121-128; Baumlein H et al. (1992) Plant J 2(2):233-9; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), USP (unknown seed protein; Baumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), Napins (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519), Saccharosebindeproteins
- 40 (WO 00/26388), Oleosins (WO 98/45461), oder der Bce4-Promoter aus Brassica (WO 91/13980). Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase) oder

die Stärkesynthese. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben.

5 Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens). Weitere samenspezifische
10 Promotoren sind beschrieben in WO 89/03887.

b) Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Promotor des Patatin Gens (GenBank Acc.-No.: A08215), den Patatin Promotor Klasse I
15 B33-Promotor (GenBank Acc.-No.: X14483) oder den Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor beschrieben durch SEQ ID NO: 29. Knollen-spezifische Promotoren sind im Rahmen der Erfindung insbesondere zum Erzielen einer Resistenz gegen *Phytophthora*
20 *infestans* geeignet. Da obligat-biotrophe Pilze nur Blätter befallen, ist eine Aktivität im epidermalen Knollengewebe unerheblich.

c) Blütenspezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder den Promotor
25 des P-rr Gens (WO 98/22593).

d) Antheren-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1
30 Promotor und den γ -Zein Promotor.

e) Ährenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der in US 6,291,666. Ähren-spezifische Promotoren sind insbesondere zur
35 Vermittlung einer Resistenz gegen *Fusarium* vorteilhaft.

f) Mesophyll-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Promotor des Weizen Germin 9f-3.8 Gens (GenBank Acc.-No.: M63224) oder der Gerste GerA Promotor (WO 02/057412). Besagte
40 Promotoren sind insbesondere vorteilhaft, da sie sowohl mesophyll-spezifisch und pathogen-induzierbar sind. Ferner geeignet ist der mesophyll-spezifische Arabidopsis CAB-2 Promotor (GenBank Acc.-No.: X15222), sowie der Zea mays PPCZm1 Promotor (GenBank Acc.-No.: X63869). Insbesondere

37

bevorzugt sind die Promotor beschrieben durch SEQ ID NO: 30, 31 oder 32.

- Die in den erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten oder Vektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluß auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Streßfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstreß, Abscisinsäure (Lam E & Chua NH (1991) J Biol Chem 266(26):17131-17135) und Hitzestreß (Schoffl F et al. (1989) Mol Gen Genet 217(2-3):246-53) beschrieben.
- Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielfür für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebsspezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).
- Die rekombinante Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte rekombinante Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der rekombinant zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die rekombinant zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im

Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die
5 im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalin-Synthase)-Terminator.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die
10 eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel der natürliche Promoter eines B11-Gens gegen einen der bevorzugten gewebespezifischen Promoter ausgetauscht werden. Methoden wie
15 die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der rekombinanten Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die
20 später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Eine rekombinante Expressionskassetten und die von ihr abgeleiteten Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen
25 und meint all solche Elemente, die einen Einfluß auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten, Vektoren oder rekombinanten Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

30

a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt
35 Herbizide, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, oder Phosphinotricin etc. verleihen. Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat®
40 degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine

- Dehalogenase, die Dalapon[®] inaktiviert), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferase (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthase Gen (ALS), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).
- 15 b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784; Haseloff et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2122-2127; Reichel et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(12):5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228; Chui WL et al. (1996) Curr Biol 6:325-330; Leffell SM et al. (1997) Biotechniques. 23(5):912-8), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859; Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414), das Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), die β -Galactosidase, R-Locus Gen (kodieren ein Protein, das die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der Promotoraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfstoffe oder chromogener Substrate ermöglicht; Dellaporta et al., In: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988), ganz besonders bevorzugt ist die β -Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907).
- 40 c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322

ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

- 5 d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzentransformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.
- 10 Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor
- 15 wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).
- 20 Die Einführung einer erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassette in einen Organismus oder Zellen, Gewebe, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen), kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in
- 25 denen die rekombinanten Expressionskassetten enthalten sind. Die rekombinante Expressionskassette kann in den Vektor (zum Beispiel ein Plasmid) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Das entstandene Plasmid wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt
- 30 transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und das rekombinante Plasmid mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen.
- 35 Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobacterien sein. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Einführung der rekombinanten Expressionskassette mittels Plasmidvektoren realisiert. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der
- 40 rekombinanten Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA, RNA oder Protein in die entsprechende

Wirtszelle eingebracht wird.

Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von
5 Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) Methods Enzymol 185:527-537; Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S. 128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol
10 42:205-225).

So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch,
15 zum Beispiel mit Polyethylenglykol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur
20 Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilanz et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116;
25 Neuhaase et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73 ; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231 ; DeBlock et al. (1989) Plant Physiol 91:694-701).

30 Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte
35 DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.

40 Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes durchgeführt werden. Die Agrobacterium-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen

geeignet. Die Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985) Science 225: 1229f).

- Werden Agrobacterien verwendet, so ist die rekombinante
- 5 Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und
- 10 die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden rekombinanten Expressionskassette verbunden.
- Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren
- 15 können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobacterium transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet
- 20 163:181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter Agrobakteria und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die
- 25 Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant
- 30 Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f; Clontech Laboratories, Inc.
- 35 USA). Weitere zur Expression in Pflanzen geeignet Promotoren sind beschrieben (Rogers et al. (1987) Methods Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).
- 40 Direkte Transformationstechniken eignen sich im Prinzip für jeden Organismus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können

verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist er erforderlich, das sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

- 5
- Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist.
- 10 Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von
- 15 Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel für geeignete Selektionsmarker sind oben genannt. Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem
- 20 Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Sproß und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprößlinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden. Dem
- 25 Fachmann sind Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992) Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533
- 30 verwendet. Die erhaltenen Pflanzen können in der üblichen Weise gezüchtet und/oder gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.
- 35 Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhaft mit weiteren Verfahren die eine Pathogenresistenz (beispielsweise gegen Insekten, Pilze, Bakterien, Nematoden etc.), Streßresistenz oder eine andere Verbesserung der pflanzlichen Eigenschaften bewirken kombiniert werden. Beispiele sind u.a. genannt bei Dunwell JM
- 40 (2000) J Exp Bot. 51 Spec No:487-96.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Polypeptidsequenzen kodierend für B11 Protein umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30 oder 32,
- 5 b) Sequenzen die eine Homologie von mindestens 90%, bevorzugt mindestens 95%, besonders bevorzugt mindesten 98% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30 oder 32 aufweisen, und
- 10 c) Sequenzen die mindestens 10, bevorzugt mindestens 20, besonders bevorzugt mindestens 30 zusammenhängende Aminosäuren einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30 oder 32 umfassen.
- 15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen kodierend für die erfindungsgemäßen neuen Polypeptidsequenzen kodierend für BII-Proteine. Bevorzugt sind die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 oder 31, die dazu komplementäre
- 20 Nukleinsäuresequenz und die durch Entartung (Degeneration) des genetischen Codes abgeleitete Sequenzen.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft rekombinante Expressionskassetten, die eine der erfindungsgemäßen
- 25 Nukleinsäuresequenzen umfassen. In den erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten ist die Nukleinsäuresequenz kodierend für das BII-Protein aus Gerste mit mindestens einem genetischen Kontrollelement nach obiger Definition derart verknüpft, das die Expression (Transkription und ggf.
- 30 Translation) in einem beliebigen Organismus - bevorzugt in Pflanzen - realisiert werden kann. Dazu geeignete genetische Kontrollelemente sind oben beschrieben. Die rekombinanten Expressionskassetten können auch weitere Funktionselementen gemäß obiger Definition enthalten. Die insertierte
- 35 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII-Protein aus Gerste kann in sense- oder antisense-Orientierung in die Expressionskassette insertiert sein, und damit zu Expression von sense- oder antisense-RNA führen. Erfindungsgemäß sind auch rekombinante Vektoren, die die rekombinanten
- 40 Expressionskassetten beinhalten.

"Rekombinant" meint bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend besagte Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus

transformiert mit besagter Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommene Konstruktionen, in denen sich entweder

5

a) die B11 Nukleinsäuresequenz, oder

b) eine mit der B11 Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder

10

c) (a) und (b)

15

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall

20

einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die

25

Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende

30

Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des B11-Promotors mit dem entsprechenden B11-Gen - wird zu einer rekombinanten Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

35

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft rekombinante Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder einem

erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter,

40

Wurzeln usw. - oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen. Organismus ist breit zu verstehen und meint prokaryotische und eukaryotische Organismen, bevorzugt Bakterien, Hefen, Pilze, tierische und pflanzliche Organismen. Als rekombinante Organismen bevorzugte Wirts- oder

Ausgangsorganismen sind vor allem Pflanzen gemäß der oben genannten Definition.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung
5 der erfindungsgemäßen, rekombinanten Organismen und der von
ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel
bei rekombinanten pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-
, und rekombinantes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur
Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder
10 Feinchemikalien.

Sequenzen

- 5 1. SEQ ID NO: 1 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
2. SEQ ID NO: 2 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
- 10 3. SEQ ID NO: 3 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*.
4. SEQ ID NO: 4 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*.
- 15 5. SEQ ID NO: 5 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Tabak.
- 20 6. SEQ ID NO: 6 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Tabak.
7. SEQ ID NO: 7 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Reis.
- 25 8. SEQ ID NO: 8 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Reis.
9. SEQ ID NO: 9 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Raps.
- 30 10. SEQ ID NO: 10 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BI1 Protein aus Raps.
- 35 11. SEQ ID NO: 11 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Soja.
12. SEQ ID NO: 12 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Soja.
- 40 13. SEQ ID NO: 13 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Soja.
14. SEQ ID NO: 14 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Soja.

15. SEQ ID NO: 15 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil
eines BI1 Protein aus Weizen.
- 5 16. SEQ ID NO: 16 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil
eines BI1 Protein aus Weizen.
17. SEQ ID NO: 17 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil
eines BI1 Protein aus Mais.
- 10 18. SEQ ID NO: 18 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil
eines BI1 Protein aus Mais.
19. SEQ ID NO: 19 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil
eines BI1 Protein aus Weizen.
- 15 20. SEQ ID NO: 20 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil
eines BI1 Protein aus Weizen.
- 20 21. SEQ ID NO: 21 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil
eines BI1 Protein aus Mais.
22. SEQ ID NO: 22 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil
eines BI1 Protein aus Mais.
- 25 23. SEQ ID NO: 23 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil
eines BI1 Protein aus Mais.
24. SEQ ID NO: 24 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil
eines BI1 Protein aus Mais.
- 30 25. SEQ ID NO: 25 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil
eines BI1 Protein aus Weizen.
- 35 26. SEQ ID NO: 26 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil
eines BI1 Protein aus Weizen.
27. SEQ ID NO: 27 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil
eines BI1 Protein aus Mais.
- 40 28. SEQ ID NO: 28 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil
eines BI1 Protein aus Mais.
29. SEQ ID NO: 29 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den

Patatin Promotor aus Kartoffel.

- 5 30. SEQ ID NO: 30 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den
Germin 9f-3.8 Promotor aus Weizen.
31. SEQ ID NO: 31 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den
Arabidopsis CAB-2 Promotor
- 10 32. SEQ ID NO: 32 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den
PPCZm1 Promotor aus Mais
33. SEQ ID NO: 33 : Nukleinsäuresequenz kodierend für
rekombinanten Expressionsvektor pUbiBI-1
- 15 34. SEQ ID NO: 34 : Nukleinsäuresequenz kodierend für
rekombinanten Expressionsvektor
pLol14UbiBI-1
- 20 35. SEQ ID NO: 35 : Nukleinsäuresequenz kodierend für
rekombinanten Expressionsvektor pOXoBI-1
- 25 36. SEQ ID NO: 36 : Nukleinsäuresequenz kodierend für
rekombinanten Expressionsvektor
pLol14OXoBI-1

Abbildungen

- 30 1. Fig. 1a-d: Vergleich von Proteinsequenzen verschiedener BI-
1 Proteine aus Pflanzen. AtBI-1: Arabidopsis; BnBI-1:
Brassica napus (Raps); GmBI2: Glycine max (Soja; Variante
1); GmBI3: Glycine max (Soja; Variante 2); HVBI-1: Hordeum
vulgare (Gerste); NtBI-1: Nicotiana tabacum (Tabak); OsBI-1:
Oryza sativa (Reis); TaBI11: Triticum aestivum (Weizen,
35 Variante 1); TaBI18: Triticum aestivum (Weizen, Variante 2);
TaBI5 neu: Triticum aestivum (Weizen, Variante 3); ZmBI14:
Zea mays (Mais; Variante 1); ZmBI16: Zea mays (Mais;
Variante 2); ZmBI33: Zea mays (Mais; Variante 3); ZmBI8: Zea
mays (Mais; Variante 4); Consensus: Aus dem Alignment
40 abgeleitete Konsensussequenz.
2. Fig. 2: Vektorkarte für Vektor pUbiBI-1 (Ubi: Ubiquitin-
Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-
Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind

ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.

- 5 3. Fig. 3: Vektorkarte für Vektor pLO114UbiBI-1 (Ubi: Ubiquitin-Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BII-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
- 10 4. Fig. 4: Vektorkarte für Vektor pOxoBI-1 (Oxo: TaGermin 9f-2.8 Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BII-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
- 15 5. Fig. 5: Vektorkarte für Vektor pLO114OxoBI-1 (Oxo: TaGermin 9f-2.8 Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BII-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
- 20 6. Fig. 6: Vergleich der Proteinssequenzen von BI-1 Proteinen aus Gerste (*Hordeum vulgare*, GenBank Acc.-No.: CAC37797), Reis (*Oryza sativa*, GenBank Acc.-No.: Q9MBD8), *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: Q9LD45) und Mensch (*Homo sapiens*, GenBank Acc.-No.: AAB87479). Schwarzhinterlegte Aminosäuren sind identisch in allen Arten. Grau hinterlegte Aminosäuren sind nur in Pflanzen identisch. Balken zeigen die vorausgesagten sieben Transmembrandomänen in HvBI-1 an.
- 30 7. Fig. 7: BI-1 Expression in resistenten und suszeptiblen Gersten-Linien (cDNA Gelblot-Analyse): cDNAs wurde mittels RT-PCR ausgehend von Gesamt-RNA synthetisiert. Gesamt-RNA wurde aus suszeptibler Gersten-Linie Pallas, resistenter Gersten-Linie BCPMla12 und resistenter Gersten-Linie BCPmlo5 zum Zeitpunkt 0 (d.h. unmittelbar vor Inokkulation), sowie jeweils 1, 4 und 7 Tage nach Inokkulation mit Bgh und parallel dazu aus nicht-infizierten Kontrollpflanzen (Ø) gewonnen. Die RT-PCR für BI-1 wurde unter Verwendung von 20 Zyklen ausgeführt (s.u.). Die eingesetzte RNA-Menge (0.5 µg) wurde zusätzlich durch rRNA-Färbung mit Ethidiumbromid in Gelen kontrolliert. Wiederholung der Experimente ergab vergleichbare Resultate.
- 35
- 40

8. Fig. 8: *BI-1* wird im Mesophyllgewebe exprimiert (cDNA Gelblot-Analyse). RT-PCR wurde ausgehend von RNA isoliert aus Pallas (P) und BCPM1a12 (P10) (24 h nach Inokulation mit *BghA6*) durchgeführt. Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurden abaxiale epidermale Streifen (E, inokulierte Positionen der Blätter) vom Mesophyll und der adaxialen Epidermis (M) separiert. *Ubiquitin 1 (Ubi)* wurde als Marker eine gewebeunspezifischen Genexpression verwendet. RT-PCR wurde unter Verwendung von 30 Zyklen durchgeführt.
9. Fig. 9: *BI-1* Expression wird während chemischer Resistenzinduktion reprimiert.

(A) Chemisch induzierte Resistenz in der Gersten-Linie Pallas gg. *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* (*Bgh*). Gersten Primärblätter wurden mit 2,6-Dichloroisonicotinsäure (DCINA) behandelt und zeigten weniger Mehltau-Pustulen als entsprechende unbehandelte Kontrollpflanzen.

(B) RNA und cDNA Blots. RNA (10 µg) wurde 0, 1, 2 und 3 Tage nach Bodenbehandlung (soil drench treatment; dpt) mit DCINA bzw. der Kontrolle (Trägersubstanz) und zusätzlich 1 und 4 Tage nach Inokulation (dpi, entspricht 4 bzw. 7 dpt) analysiert. RT-PCR (*Ubi*, *BI-1*) wurde unter Verwendung von 20 Zyklen realisiert. Wiederholung führte zu vergleichbaren Ergebnissen (siehe Beispiel 2).

Als Kontrolle wurde BCI-4 eingesetzt. BCI-4 ist ein DCINA-induziertes Gen (Besser et al. (2000) Mol Plant Pathol. 1(5): 277-286) und ein Mitglied der Barley Chemically (=BTH) Induced- Genfamilie.

10. Fig. 10: Überexpression von *BI-1* induziert Super-suszeptibilität.

(A) Durchschnittliche Penetrationseffizienz von *Bgh* in 6 unabhängigen Experimenten mit *Bgh* auf Gersten-Linie Ingrid. PE von *Bgh* war signifikant ($p < 0.01$, Students t-Test) erhöht in Zellen, die mit *pBI-1* transformiert (bombardiert) wurden im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle (*pGY1*) bombardiert wurden.

(B) Die Penetrationseffizienz von *Bgh* auf Zellen die mit einem antisense-*BI-1* Konstrukt (*pasBI-1*) bombardiert wurden,

war nicht-signifikant ($p > 0.05$) vermindert im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle (pGY1). bombardiert wurden.

5 Die Säulen geben jeweils den Mittelwert der einzelnen Experimente wieder. Die Balken stellen den Standardfehler dar.

10 11. Fig. 11: Überexpression von BI-1 induziert Bruch der mlo5-vermittelten Penetrationsresistenz. Penetrationseffizienz von Bgh wurde in 3 bis 4 unabhängigen Experimenten mit Bgh auf den Gersten Linien Ingrid-mlo5 bzw. Pallas-mlo5 bewertet. PE durch Bgh war signifikant ($p < 0.05$) erhöht in Zellen, die mit pBI-1 transformiert (bombardiert) wurden im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle (pGY1). bombardiert wurden. Die Säulen geben jeweils den Mittelwert von drei unabhängigen Experimente wieder. Die Balken stellen den Standardfehler dar.

15 20 12. Fig. 12: BI-1 Expression wird durch toxische Kulturfiltrate aus *Bipolaris sorokiniana* induziert. Northern-Blots (10 µg Gesamt-RNA) mit RNA aus Ingrid (I) und BCIngrid-mlo5 (I22). RNA wurde 0, 24, 48 und 72 h nach Injektion der toxischen Kulturfiltrate von *Bipolaris sorokiniana* (T) bzw. Wasser (W) isoliert. BI-1 mRNAs wurde auf Nylonmembranen nach stringenten Waschen detektiert. BI-1: Detektion von BAX Inhibitor 1 mRNA; Ubi: Detektion von Ubiquitin 1; Asprot: Detection der Aspartatprotease mRNA; hat: Stunden nach Behandlung ("h after treatment")

25 30 13. Fig. 13: BI-1 Überexpression bricht Nicht-Wirtsresistenz von Gerste (cv. Manchuria) gegen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. Penetrationsraten wurden in drei unabhängigen Experimenten untersucht.

Beispiele

Allgemeine Methoden:

- 5 Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen,
- 10 Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

20

Beispiel 1: Pflanzen, Pathogene und Inokulation

- Die Gerstensorten Ingrid, Pallas und die rückgekreuzte Linie BCPM1a12, BCPm1o5 und BCIngrid-m1o5 (I22) wurde von Lisa Munk,
- 25 Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Kopenhagen, Dänemark zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung ist beschrieben (Kølster P et al. (1986) Crop Sci 26: 903-907).
- 30 Das 12 bis 36 h im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier vorgekeimte Saatgut wurde, wenn nicht anders beschrieben, zu je 5 Körnern an den Rand eines Vierkanttopfes (8x8cm) in Fruhstorfer Erde vom Typ P ausgelegt, mit Erde bedeckt und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Alle Pflanzen wurden in Klimaschränken
- 35 oder -kammern bei 18°C und 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16-stündigen Licht / 8-stündigen Dunkelheitszyklus mit 3000 bzw. 5000 lux (50 bzw. 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ Photonenflussdichte) 5 bis 8 Tage lang kultiviert und im Keimlingsstadium in den Versuchen verwendet. Bei Experimenten, in denen Applikationen an
- 40 Primärblättern durchgeführt wurden, waren diese vollständig entwickelt.

Vor Durchführung der transienten Transfektionsexperimente wurden die Pflanzen in Klimaschränken oder -kammern bei tagsüber 24°C,

nachts 20°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16-stündigen Licht / 8-stündigen Dunkelheitszyklus mit 30000 lux kultiviert.

- 5 Für die Inokulation von Gerstenpflanzen wurde echter Gerstenmehltau *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. hordei Em. Marchal der Rasse A6 (Wiberg A (1974) Hereditas 77: 89-148) (BghA6) verwendet. Dieser wurde vom Institut für Biometrie, JLU Gießen bereitgestellt. Die Nachzucht des Inokulums erfolgte in
- 10 Klimakammern zu den gleichen Bedingungen, wie sie oben für die Pflanzen beschrieben sind, durch Übertragung der Konidien von befallenem Pflanzenmaterial auf regelmäßig angezogene, 7 Tage alte Gerstenpflanzen cv. Golden Promise bei einer Dichte von 100 Konidien/mm².
- 15 Die Inokulation erfolgte auf primäre Blätter von Gerstenpflanzen mit nachfolgenden Konidien-Dichten: 5 Konidien/ mm² bei chemischer Induktion von Resistenz und makroskopischer Auswertung des Induktionserfolges, 50 Konidien/ mm² bei
- 20 Genexpressionsstudien und 150 Konidien/ mm² bei Überprüfung der Gentransformation mit transformierten Blattsegmenten. Die Inokulation mit BghA6 erfolgte unter Verwendung von 7 Tagen alten Keimlingen durch Abschütteln der Konidien bereits befallener Pflanzen in einem Inokulationsturm(soweit
- 25 nicht anders angegeben).

Beispiel 2: Modulation der BII Expression mit DCINA

- 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA, Syngenta AG, Basel, Schweiz; als 25% (w/w) Formulierung) wurde auf 4-Tage alte
- 30 Gerstenschößlinge der Sorte Pallas mittels Bodenbewässerung ("soil drench") in einer Endkonzentration von 8 mg/l Bodenvolumen appliziert. Die verwendete Suspension wurde mit Leitungswasser angesetzt. Als Kontrolle diente eine
- 35 Bodenbewässerung mit dem Trägermaterial (benetzbares Puder "wetable powder"). Nach drei Tagen wurden die Pflanzen mit *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. hordei Em. Marchal der Rasse A6 (5 Konidien/ mm²) infiziert. Pflanzen mit chemisch induzierter Resistenz (CIR) wiesen ca. 70% weniger
- 40 Mehлтаukolonien auf als die entsprechenden Kontrollpflanzen, die nur mit der Trägersubstanz behandelt wurden (Fig. 9A).

Northern Blot und RT-PCT Blots wurden zur Bestimmung der BII Transkriptmengen durchgeführt und zeigten eine überraschende

Verminderung der *B11* Expression 1 bis 3 Tage nach chemischer Behandlung (Fig. 9B).

Beispiel 3: RNA-Extraktion

5 Gesamt RNA wurde aus 8 bis 10 primären Blattsegmenten (Länge 5 cm) mittels "RNA Extraction Buffer" (AGS, Heidelberg, Germany) extrahiert. Dazu wurden die zentrale Primärblattsegment von 5 cm Länge geerntet und in flüssigem Stickstoff in Mörsern
10 homogenisiert. Das Homogenisat wurde bis zur RNA-Extraktion bei -70°C gelagert. Aus dem tiefgefrorenen Blattmaterial wurde mit Hilfe eines RNA-Extraktions-Kits (AGS, Heidelberg) Gesamt-RNA extrahiert. Dazu wurden 200 mg des tiefgefrorenen Blattmaterials in einem Mikrozentrifugenröhrchen (2 mL) mit 1,7 mL RNA-
15 Extraktionspuffer (AGS) überschichtet und sofort gut durchmischt. Nach Zugabe von 200 µL Chloroform wurde erneut gut gemischt und bei Raumtemperatur 45 min auf einem Horizontalschüttler bei 200 U/min geschüttelt. Anschließend wurde zur Phasentrennung 15 min bei 20000 g und 4°C
20 zentrifugiert, die obere wäßrige Phase in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die untere verworfen. Die wäßrige Phase wurde erneut mit 900 µL Chloroform gereinigt, indem 3 mal für 10 sec homogenisiert und erneut zentrifugiert (s.o.) und abgehoben wurde. Zur Fällung der RNA wurde dann
25 850 µL 2-Propanol hinzugegeben, homogenisiert und für 30 bis 60 min auf Eis gestellt. Im Anschluß daran wurde für 20 min zentrifugiert (s.o.), vorsichtig der Überstand dekantiert, 2 mL 70 %iges Ethanol (-20°C) hinzu pipettiert, durchmischt und erneut 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann wiederum
30 dekantiert und das Pelet vorsichtig mit einer Pipette von Flüssigkeitsresten befreit, bevor es an einem Reinluftarbeitsplatz im Reinluftstrom getrocknet wurde. Danach wurde die RNA in 50 µL DEPC-Wasser auf Eis gelöst, durchmischt und 5 min zentrifugiert (s.o.). 40 µl des Überstandes wurden als
35 RNA-Lösung in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bei -70°C gelagert.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die RNA-Lösung 1:99 (v/v) mit destilliertem Wasser
40 verdünnt und die Extinktion (Photometer DU 7400, Beckman) bei 260 nm gemessen ($E_{260\text{ nm}} = 1$ bei 40 µg RNA/mL). Gemäß der errechneten RNA-Gehalte wurden die Konzentrationen der RNA-Lösungen anschließend mit DEPC-Wasser auf 1 µg/µL angeglichen

und im Agarosegel überprüft.

Zur Überprüfung der RNA-Konzentrationen im horizontalen Agarosegel (1 % Agarose in 1 x MOPS-Puffer mit 0,2 µg/mL Ethidiumbromid) wurde 1 µL RNA-Lösung mit 1 µL 10 x MOPS, 1 µL Farbmaler und 7 µL DEPC-Wasser versetzt, nach Ihrer Größe bei 120 V Spannung im Gel in 1 x MOPS-Laufpuffer über 1,5 h aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. Eventuelle Konzentrationsunterschiede der RNA-Extrakte wurden mit DEPC-Wasser ausgeglichen und die Anpassung erneut im Gel überprüft.

Beispiel 4: Klonierung der B11 cDNA Sequenz aus Gerste

Der Volllängenklon von hvB11 (GenBank Acc.-No.: AJ290421) umfaßt am 3'-Ende zwei Stopp-Codons und am 5'-Ende ein potentiell Start-Codon. Der ORF überspannt 247 Aminosäuren und zeigt die höchste Sequenzhomologie zu einem B11-Gen aus Reis, Mais, Brassica napus und Arabidopsis thaliana (jeweils 86% Identität auf Nukleotidebene) sowie einem humanen B11-Homolog (53% Ähnlichkeit) (Fig. 1 und 6). Die Aminosäuresequenz von hvB11 umfaßt sieben potentielle Transmembrandomänen mit einer Orientierung des C-Terminus im Cytosol.

Nachfolgende Konstrukte wurden hergestellt:

a) Amplifikation eines 478 bp Fragment der Gerste B11 cDNA (GenBank Acc.-No.: AJ290421)

B11-sense 5'-atggacgccttctactcgacctcg-3'

B11-antisense 5'-gccagagcaggatcgacgcc-3'

b) Amplifikation eines 513 bp Ubi cDNA Fragment (GenBank Acc.-No.: M60175)

UBI-sense 5'-ccaagatgcagatcttcgtga-3'

UBI-antisense 5'-ttcgcgataggtaaaagagca-3'

c) Amplifikation eines 871 bp Volllängen B11 Leserahmens

B11VL sense 5'-ggattcaacgcgagcgcaggacaagc-3'

B11VL antisense 5'-gtcgacgcggtgacggtatctacatg-3'

Die erhaltenen Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T mittels T-Überhang-Ligation ligiert und dienten als Ausgangsplasmide für

die Herstellung von Sonden (z.B. für Northern-Blot) bzw. dsRNA. Die einzelnen Konstrukte trugen die Bezeichnung pGEMT-BI1 , pGEMT-BI1VL(240) und pGEMT-UBI.

- 5 Das BI1-Volllängenprodukt wurde aus pGEMT in die Sali Schnittstelle des pGY-1 vektors (Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O. & Dudler, R. (1999) Mol. Plant-Microbe Interact. 12, 647-654) unter Verwendung der Sali-Schnittstelle in pGEMT und mittels der dem BI1VL antisense Primer angefügten Sali-Schnittstellen umkloniert. Vektoren mit sense (pBI-1) und antisense Orientierung (pasBI-1) wurden isoliert und resequenziert. Die Vektoren enthalten die BI-1 Sequenz unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors.

15 Beispiel 5: Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

- Zum Nachweis von niedrigen Transkriptmengen wurde eine semi-quantitative RT-PCR unter Verwendung des "OneStep RT-PCR Kit" (Qiagen, Hilden, Germany) durchgeführt. Dabei wurde RNA (Isolation s.o.) zuerst in cDNA übersetzt (Reverse Transkription) und in einer anschließenden PCR-Reaktion mit spezifischen Primern die gesuchte cDNA amplifiziert. Um die Ausgangsmenge an Matrizen RNA abzuschätzen, wurde die Amplifikation während der exponentiellen Phase (nach 20 Zyklen) unterbrochen um Unterschiede in der Ziel-RNA wiederzuspiegeln. Die PCR Produkte wurden über ein Agarosegel aufgetrennt, denaturiert, auf Nylonmembranen geblottet und mit spezifischen, nicht-radioaktiv-markierten Sonden unter stringenten Standardbedingungen detektiert. Hybridisierung, Waschschr
- 20 (Qiagen, Hilden, Germany) durchgeführt. Dabei wurde RNA (Isolation s.o.) zuerst in cDNA übersetzt (Reverse Transkription) und in einer anschließenden PCR-Reaktion mit spezifischen Primern die gesuchte cDNA amplifiziert. Um die Ausgangsmenge an Matrizen RNA abzuschätzen, wurde die
- 25 Amplifikation während der exponentiellen Phase (nach 20 Zyklen) unterbrochen um Unterschiede in der Ziel-RNA wiederzuspiegeln. Die PCR Produkte wurden über ein Agarosegel aufgetrennt, denaturiert, auf Nylonmembranen geblottet und mit spezifischen, nicht-radioaktiv-markierten Sonden unter stringenten
- 30 Standardbedingungen detektiert. Hybridisierung, Waschschr
- und Immunodetektion erfolgten wie unter "Northern Blot" beschrieben. Für die einzelnen Reaktionen (25 µL-Ansatz) wurden unter Verwendung des "One Step RT-PCR Kit" (Qiagen, Hilden, Deutschland) zusammengegeben:

- 35 1000 ng Gesamt-RNA einer bestimmten Probe
0,4 mM dNTPs,
jeweils 0,6 µM sense- und antisense-Primer
0,10 µl RNase-Inhibitor
- 40 1 µL Enzymmix in 1x RT-Puffer

Die cDNA-Synthese (reverse Transkription) erfolgte für 30 min bei 50°C. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 15 min bei 95°C inaktiviert, was zugleich Aktivierung der DNA-

Polymerase und Denaturierung der cDNA bewirkt. Anschließend folgt eine PCR gemäß nachfolgendem Programm: 1 min mit 94 °C; 25 Zyklen mit 1 min mit 94 °C; 1 min mit 54°C und 1 min mit 72°C; abschließend 10 min mit 72°C. Dann Lagerung bei 4°C bis zur

5 Weiterverarbeitung. Die PCR-Produkte wurden im 1xTBE-Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Für die einzelnen Ansätze wurden mit den oben angegebenen Primer-Paaren amplifiziert.

Beispiel 6: Northern-Blot Analyse

10

Zur Vorbereitung des Northern-Blottings wurde die RNA im Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Ein Teil RNA-Lösung (entsprechend 10 µg RNA) wurde dazu mit gleichem Volumen Probenpuffer (mit Ethidiumbromid) gemischt, 5 min bei

15 94°C denaturiert, 5 min auf Eis gestellt, kurz zentrifugiert und aufs Gel aufgetragen. Das 1 x MOPS-Gel (1,5 % Agarose, ultra pure) enthielt 5 Volumenprozent konzentrierte Formaldehydlösung (36,5 % [v/v]). Die RNA wurde bei 100 V 2 h lang aufgetrennt und anschließend geblottet.

20

Das Northern-Blotting erfolgte als aufwärtsgerichteter RNA-Transfer im Kapillarstrom. Das Gel wurde dazu zunächst 30 min in 25 mM Natriumhydrogen/dihydrogenphosphat-Puffer (pH 6,5) geschwenkt und zurechtgeschnitten. Ein Whatmanpapier wurde so

25 vorbereitet, dass es auf einer horizontalen Platte auflag und auf 2 Seiten in eine Wanne mit 25 mM Natriumhydrogen/dihydrogenphosphat-Puffer (pH 6,5) ragte. Auf dieses Papier wurde das Gel aufgelegt, wobei nicht bedeckte Teile des Whatmanpapiers mit einer Plastikfolie abgedeckt

30 wurden. Das Gel wurde dann mit einer positiv geladenen Nylonmembran (Boehringer-Mannheim) luftblasenfrei abgedeckt, wonach die Membran wiederum mit saugfähigem Papier in mehreren Lagen etwa 5 cm hoch bedeckt wurde. Das saugfähige Papier wurde noch mit einer Glasplatte und einem 100 g Gewicht beschwert. Das

35 Blotting erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Membran wurde kurz in A. bidest. geschwenkt und zur RNA-Fixierung mit einer Lichtenergie von 125 mJ im *Crosslinker* (Biorad) UV-Licht bestrahlt. Die Überprüfung des gleichmäßigen RNA-Transfers auf die Membran erfolgte auf der UV-Lichtbank.

40

Zur Detektion von Gersten mRNA wurden 10 mg Gesamt-RNA aus jeder Probe über ein Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillartransfer auf eine positiv-geladene Nylonmembran geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem DIG-Systeme nach

Herstellerangaben unter Verwendung von Digoxigenin-markierten antisense-RNA Sonden (wie beschrieben in Hückelhoven R et al. (2001) Plant Mol Biol 47:739-748).

- 5 Herstellung der Sonden: Zur Hybridisierung mit den zu detektierenden mRNAs wurden mit Digoxigenin oder Fluoreszein markierte RNA Sonden hergestellt. Diese wurden durch *in vitro* Transkription eines PCR-Produktes mittels einer T7 oder SP6 RNA Polymerase mit markierten UTPs erstellt. Als Vorlage für die PCR
- 10 gestützte Amplifikation dienten die oben beschriebenen Plasmidvektoren pGEMT-BI1, pGEMT-UBI. Je nach Orientierung des Inserts wurden unterschiedliche RNA-Polymerasen zur Herstellung des antisense-Stranges herangezogen. Die T7-RNA-Polymerase wurde für pGEMT-BI1 verwendet, die SP6-RNA-Polymerase für pGEMT-
- 15 UBI. Das Insert der einzelnen Vektor wurde über PCR mit flankierenden Standard-Primern (M13 fwd und rev) amplifiziert. Die Reaktion lief dabei mit folgenden Endkonzentrationen in einem Gesamtvolumen von 50 µL PCR-Puffer (Silverstar) ab:
- 20 M13-fwd: 5'-GTAAAACGACGGCCAGTG-3'
M13-Rev: 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'
- 25 10 % Dimethylsulfoxid (v/v)
je 2 ng/µL Primer (M13 forward und reversed)
1,5 mM MgCl₂,
0,2 mM dNTPs,
4 Units Taq-Polymerase (Silverstar),
2 ng/µL Plasmid-DNA.
- 30 Die Amplifikation verlief in einem *Thermocycler* (Perkin-Elmer 2400) temperaturgesteuert mit nachfolgendem Temperaturprogramm: 94°C für 3 min; 30 Zyklen mit 94°C für 30 sek, 58°C für 30 sek und 72°C für 1,2 min; 72°C für 5 min; anschließend Kühlung bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung. Der Erfolg der Reaktion wurde im
- 35 1 %igen Agarosegel überprüft. Die Produkte wurden anschließend mit einem "High Pure PCR-Product Purification Kit" (Boehringer-Mannheim) aufgereinigt. Man erhielt etwa 40 µL Säuleneluat, das erneut im Gel überprüft und bei -20°C gelagert wurde.
- 40 Die RNA Polymerisation, die Hybridisierung und die Immuno-detektion wurden weitestgehend nach Angaben des Herstellers des Kits zur nicht-radioaktiven RNA-Detektion durchgeführt (*DIG System User's Guide, DIG-Luminescence detection Kit*, Boehringer-Mannheim, Kogel et al. (1994) Plant Physiol 106:1264-1277). 4 µl

gereinigtes PCR-Produkt wurden mit 2 µL Transskriptionspuffer, 2 µL NTP-Markierungsmix, 2 µL-NTP-Mix und 10 µL DEPC-Wasser versetzt. Anschließend wurden 2 µL der T7-RNA-Polymeraselösung zu pipettiert. Die Reaktion wurde dann 2 h bei 37°C durchgeführt und anschließend mit DEPC-Wasser auf 100 µL aufgefüllt. Die RNA-Sonde wurde im Ethidiumbromidgel detektiert und bei -20°C gelagert.

Zur Vorbereitung der Hybridisierung wurden die Membranen zunächst 1 h bei 68°C in 2 x SSC (Salt, Sodiumcitrate), 0,1 % SDS-Puffer (Natriumdodecylsulfat) geschwenkt, wobei der Puffer 2 bis 3 mal erneuert wurde. Die Membranen wurden anschließend an die Innenwand auf 68°C vorgeheizter Hybridisierungsröhren angelegt und 30 min mit 10 mL Dig-Easy-Hybridisierungspuffer im vorgeheizten Hybridisierungssofen inkubiert. Währenddessen wurden 10 µL Sondenlösung in 80 µL Hybridisierungspuffer bei 94°C für 5 min denaturiert, anschließend auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Zur Hybridisierung wurde die Sonde dann in 10 mL 68°C warmem Hybridisierungspuffer überführt, und der Puffer in der Hybridisierungsröhre durch diesen Sondenpuffer ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte dann ebenfalls bei 68°C über Nacht. Vor Immundetektion von RNA-RNA Hybriden wurden die Blots stringent zweimal für jeweils 20 min in 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 x SSC bei 68°C gewaschen. Zur Immunodetektion wurden die Blots zunächst zweimal für 5 min bei RT in 2 x SSC, 0,1 % SDS geschwenkt. Anschließend erfolgten 2 stringente Waschschrte bei 68°C in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS für je 15 min. Die Lösung wurde anschließend durch Waschpuffer ohne Tween ersetzt. Es wurde 1 min geschüttelt und die Lösung durch Blocking-Reagenz ausgetauscht. Nach weiteren 30 min Schütteln wurden 10 µL Anti-Fluoreszein-Antikörperlösung hinzugefügt und weitere 60 min geschüttelt. Es folgten zwei 15 minütige Waschschrte in Waschpuffer mit Tween. Die Membran wurde anschließend 2 min in Substratpuffer äquilibriert und nach Abtropfen auf eine Kopierfolie überführt. Auf der "RNA-Seite" der Membran wurde dann ein Gemisch aus 20 µL CDP-Star™ und 2 mL Substratpuffer gleichmäßig verteilt. Im Anschluß wurde die Membran mit einer zweiten Kopierfolie abgedeckt und an den Rändern mit Hitze luftblasenfrei und wasserdicht verschweißt. Die Membran wurde dann in einer Dunkelkammer für 10 min mit einem Röntgenfilm bedeckt und dieser anschließend entwickelt. Je nach Stärke der Lumineszenzreaktion wurde die Belichtungszeit variiert.

Wenn nicht extra gekennzeichnet waren die Lösungen im

61

Lieferumfang des Kits enthalten (*DIG-Luminescence detection Kit*, Boehringer-Mannheim). Alle anderen wurden aus folgenden Stammlösungen durch Verdünnung mit autoklaviertem, destilliertem Wasser hergestellt. Alle Stammlösungen wurden, wenn nicht anders

5 spezifiziert, mit DEPC (wie DEPC-Wasser) angesetzt und anschließend autoklaviert.

- 10 - DEPC-Wasser: Destilliertes Wasser wird über Nacht bei 37°C mit Diethylpyrokarbonat (DEPC, 0,1 %, w/v) behandelt und anschließend autoklaviert
- 15 - 10 x MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS (Morpholin-3-propansulfonsäure), 0,05 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA, pH mit 10 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt
- 20 - 20 x SSC (Natriumchlorid-Natriumzitat, *Salt-Sodiumcitrate*): 3 M NaClO, 0,3 M triNatriumcitrat x 2 H₂O, pH mit 4 M HCl auf pH 7,0 eingestellt.
- 25 - 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat, *Sodiumdodecylsulfate*) Natriumdodecylsulfat (w/v), ohne DEPC
- RNA-Probenpuffer: 760 µL Formamid, 260 µL Formaldehyd, 100 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL), 80 µL Glycerol, 80 µL Bromphenolblau (gesättigt), 160 µL 10 x MOPS, 100 µL Wasser.
- 10 x Waschpuffer ohne Tween: 1,0 M Maleinsäure, 1,5 M NaCl; ohne DEPC, mit NaOH (fest, ca. 77 g) und 10 M NaOH auf pH 7,5 einstellen.
- 30 - Waschpuffer mit Tween: aus Waschpuffer ohne Tween mit Tween (0,3 %, v/v)
- 35 - 10 x Blockingreagenz: 50 g Blockingpulver (Boehringer-Mannheim) in 500 mL Waschpuffer ohne Tween suspendieren.
- Substratpuffer: 100 mM Tris (Trishydroxymethylamino-methan), 150 mM NaCl mit 4 M HCl auf pH 9,5 einstellen.
- 40 - 10 x Farbmarker: 50 % Glycerol (v/v), 1,0 mM EDTA pH 8,0, 0,25 % Bromphenolblau (w/v), 0,25 % Xylencyanol (w/v).

Eine BI1 Expression wurde wie beschrieben mit RT-PCR und cDNA Gelblots untersucht und ergab, dass BI1 überwiegend im

Mesophyllgewebe von Blättern exprimiert wird, während Ubiquitin konstitutiv gleichmäßig in Epidermis und Mesophyll exprimiert wird (Fig. 8).

- 5 Ferner ist eine Expression von BI1 als Reaktion auf Behandlung der Pflanzen mit toxischen Kulturfiltraten von *Bipolaris sorokiniana* zu beobachten. Primärblätter der Gerste zeigen typische nekrotische Flecke (leaf spot blotch symptoms) nach Behandlung der Pflanzen mit toxischen Kulturfiltraten von
- 10 *Bipolaris sorokiniana* (durchgeführt wie bei Kumar et al. 2001 beschrieben). Die Blattnekrosen waren erkennbar 48 h nach Behandlung. Der beobachtete Gewebeschaden war in der Bgh-resistenten Linie BCIngrid-mlo5 (I22) deutlicher ausgeprägt als in der Elterlinie Ingrid (Mlo-Genotype, Kumar et al. 2001). Die
- 15 Expression von BI1 korreliert 72 h nach Behandlung (hat) mit der Ausprägung der Blattnekrosen (Fig. 12).

Beispiel 7:

- 20 Die zur stabilen, mesophyll-spezifischen Überexpression wird der Oxalat-Oxidase Promoter (germin 9f-2.8) aus Weizen eingesetzt. In Gerste ist die entsprechende Oxalat-Oxidase Expression Mesophyll-spezifisch, schwach konstitutiv und Pathogen-responsiv (Gegersen PL et al. (1997) *Physiol Mol Plant Pathol* 51: 85-97).
- 25 Er kann deshalb zur Mesophyll-spezifischen Expression von BI1 genutzt werden. Zur Kontrolle wird HvBI1 unter Kontrolle des Mais-Ubiquitinpromoters (Christensen AH et al. (1992) *Plant Mol Biol* 18:675-689) oder des Reis-Aktinpromoters überexprimiert (Zhang W et al. (1991) *Plant Cell* 3:1155-1165). Eingesetzt
- 30 werden nachfolgende Konstrukte:
- a) pUbiBI-1 (SEQ ID NO: 33; für transiente Gerstentransformation und Weizentransformation mit Partikel Bombardement. Expression von BI-1 unter Kontrolle des Mais Ubiquitin Promotors).
- 35
- b) pLol14UbiBI-1 (SEQ ID NO: 34; erhalten durch Umklonierung der Ubi/BI-1 Expressionscassette als EcoR1-Fragment aus pUbiBI-1 in pLol14-GUS-Kan; Binärer Vektor für transiente
- 40 Gerstentransformation mit *A. tumefaciens*)
- c) pOXoBI-1 (SEQ ID NO: 35; Mesophyllspezifischer TaGermin 9f-2.8 Promoter vor BI1 zur Weizentrafo über Partikelbombardement.

d) pLo114OXoBI-1 (SEQ ID NO: 36)

- Es werden Wildtypgerste und Weizen sowie *mlo*-Gerste transformiert, vermehrt und geselbstet. Die Transformation von Gerste und Weizen erfolgt wie beschrieben (Repellin A et al. (2001) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 159-183): Dazu werden Kalli aus unreifen Weizen- (bzw. Gersten-) Embryonen über biolistischen Gentransfer mit Mikroprojektilen transformiert. Dabei werden pUC basierte Vektoren zusammen mit Vektoren die Selektionsmarker tragen kotransformiert. Anschließend werden die Embryonen auf Selektionsmedium kultiviert und regeneriert. Gerste wird mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Dabei wird ein binärer Vektor auf Basis von pCambia_1301 eingesetzt. Unreife Embryonen von Gerste werden mit *A. tumefaciens* kokultiviert, selektiert und anschließend regeneriert (Repellin A et al. (2001) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 159-183; Horvath H et al. (2003) Proc Natl. Acad Sci USA 100: 365-369; Horvath H et al. (2002) in Barley Science, eds. Slafer, G. A., Molina-Cano, J. L., Savin, R., Araus, J. L. & Romagosa, J. (Harworth, New York), pp. 143-176; Tingay S et al. (1997) Plant J. 11: 1369-1376).
- Die transgenen (rekombinanten) Gersten- und Weizenpflanzen der T1 oder T2-Generation werden auf Resistenz gegenüber hemibiotrophen und perthotrophen Erregern geprüft. Dazu werden die Blätter mit verschiedenen Pathogenen inokuliert. Als biotrophe Erreger werden Gerstenmehltau (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) und Braunrost (*Puccinia hordei*) verwendet. Als Maß der Mehltauanfälligkeit wird die Pustelzahl pro Blattfläche 5-7 Tage nach Inokulation mit 2-5 Konidien pro mm² Blattfläche ausgewertet (Beßer K et al. (2000) Mol Plant Pathology 1: 277-286). Als hemibiotrophe Erreger werden *Bipolaris sorokiniana* n und *Magnaporthe grisea* verwendet. Die Inokulation erfolgt wie zuvor beschrieben (Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91: 127-133; Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Inter 12: 508-514). Als Maß für die Anfälligkeit dient die Anzahl und Größe der Blattläsionen 2 bis 6 Tage nach Sprühinokulation mit Konidien (Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133; Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Inter 12:508-514; Jarosch B et al. (2003) Mol Plant Microbe Inter 16:107-114.). Als perthotropher Erreger wird *Fusarium graminearum* verwendet.

64

Zur Bestimmung der Fusarium Head Blight (FHB) Typ I-Resistenz werden Weizenähren in einem frühen Blühstadium mit einer Makrokonidien-Suspension (ca. $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$) von *Fusarium graminearum* bzw. *Fusarium culmorum* besprüht. Die inokulierten Pflanzen werden für 3 Tage in eine Nebelkammer mit 25°C Lufttemperatur und 100% relativer Luftfeuchte transferriert. Danach werden die Pflanzen im Gewächshaus unter Dauerlicht bei einer Temperatur von 20°C inkubiert und die Stärke der FHB-Symptome über die Ähre hinweg nach 5, 7 und 8 Tagen evaluiert.

Zur Quantifizierung der Fusarium Head Blight (FHB) Typ II-Resistenz werden jeweils 10 - 20 µl Aliquots einer Makrokonidien-Suspension (ca. $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$) von *Fusarium graminearum* bzw. *Fusarium culmorum* in einzelne, relativ zentral gelegene Ährchen von Weizenpflanzen injiziert. Die inokulierten Pflanzen werden für 3 Tage in eine Nebelkammer mit 25°C Lufttemperatur und 100% relativer Luftfeuchte transferriert. Danach werden die Pflanzen im Gewächshaus unter Dauerlicht bei einer Temperatur von 20°C inkubiert und die Ausbreitung der FHB-Symptome über die Ähre hinweg nach 7, 14 und 21 Tagen evaluiert. Die Ausbreitung der Symptome über die Ähre (das sog. Fusarium-Spreading) wird als Mass für die FHB Typ II-Resistenz genommen.

Vergleichsbeispiel 1: Transiente B11 Expression in der Epidermis und Evaluation der Pilzpathogenentwicklung

Gerste cv Ingrid Blattsegmente wurden mit einer pGY-B11 zusammen mit einem GFP-Expressionsvektor transformiert. Anschließend wurden die Blätter mit Bgh inokuliert und das Ergebnis nach 48 h mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Penetration in GFP-exprimierenden Zellen wurde mittels Detektion von Haustorien in lebenden Zellen und durch Bewertung der Pilzentwicklung aufin eben diesen Zellen beurteilt. Es wurde ein Verfahren zur transienten Transformation eingesetzt, das bereits für die biolistische Einführung von DNA und RNA in epidermale Zellen von Gerstenblättern beschrieben wurde (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24:895-903).

Für Microcarrier-Präparation wurden 55 mg Wolframpartikel (M 17, Durchmesser 1,1 µm; Bio-Rad, München) zweimal mit 1 ml autoklaviertem Destilliertem Wasser und einmal mit 1 mL

absolutem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml 50 %igem Glycerin aufgenommen (ca. 50 mg/ml Stammlösung). Die Lösung wurde mit 50%igem Glycerin auf 25 mg/ml verdünnt, vor Gebrauch gut gemischt und im Ultraschallbad suspendiert.

5

Zur Microcarrier-Beschichtung wurden pro Schuß 0,3 µg Plasmid pGFP (GFP unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors; Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant-Microbe Interact* 12:647-654.), 0,7 µg Leervektor pGY bzw. pGY-B11 (1 µL), 12,5 µl Wolframpartikel-Suspension (25 mg/ml; entsprechend 312 µg Wolframpartikel), 12,5 µl 1 M Ca(NO₃)₂-Lösung (pH 10) tropfenweise unter ständigem Mischen zusammengegeben, 10 min bei RT stehengelassen, kurz zentrifugiert und 20 µl vom Überstand abgenommen. Der Rest mit den Wolframpartikel wird resuspendiert (Ultraschallbad) und ins Experiment eingesetzt.

15

Es wurden ca. 4 cm lange Segmente von Gerstenprimärblättern verwendet. Die Gewebe wurden auf 0,5 % Phytagar (GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe) mit 20 µg/ml Benzimidazol in Petrischalen (6,5 cm Durchmesser) gelegt und direkt vor dem Partikelbeschuss an den Rändern mit einer Schablone mit einer rechteckigen Aussparung von 2,2 cm x 2,3 cm abgedeckt. Die Schalen wurden nacheinander auf den Boden der Vakuumkammer (Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12:647-54) gestellt, über dem ein Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) als Diffusor auf einer Lochplatte eingeschoben war (5 cm über dem Boden, 11 cm unterhalb des Macrocarriers, s.u.), um Partikelklumpen zu zerstreuen und den Partikelstrom abzubremesen. Der oben an der Kammer angebrachte Macrocarrier (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) wurde je Schuss mit 5,8 µL DNA-beschichteten Wolframpartikeln (Microcarrier, s.u.) beladen. Mit einer Membranvakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim) wurde der Druck um 0,9 bar in der Kammer reduziert und die Wolframpartikel mit 9 bar Heliumgasdruck auf die Oberfläche des Pflanzengewebes geschossen. Sofort danach wurde die Kammer belüftet. Zur Markierung transformierter Zellen wurden die Blätter mit dem Plasmid (pGFP; Vektor auf pUC18-Basis, CaMV 35S-Promoter/Terminator-Kassette mit inseriertem GFP-Gen; Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12:647-54; zur Verfügung gestellt von Dr. P. Schweizer, Institut für Pflanzengenetik IPK, Gatersleben, Deutschland) beschossen. Vor dem Schießen eines anderen Plasmids wurde der Macrocarrier jeweils gründlich mit Wasser gereinigt. Nach vierstündiger

30

35

40

- Inkubation nach dem Beschuß bei leicht geöffneten Petrischalen, RT und Tageslicht wurden die Blätter mit 100 Konidien/mm² des Echten Gerstenmehltaupilzes (Rasse A6; *Blumeria graminis f.sp. hordei* Mehltau A6) inokuliert und für weitere 40 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Penetration ausgewertet. Das Ergebnis (z.B. die Penetrationseffizienz, definiert als prozentualer Anteil angegriffener Zellen, die ein mit reifem Haustorium und einer Sekundärhyphae ("secondary elongating hyphae"), wurde mittels Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie analysiert. Eine Inokulation mit 150 Conidia/mm² ergibt eine Angriffsfrequenz von ca. 50 % der transformierten Zellen. Für jedes einzelne Experiment wurde eine minimale Anzahl von 100 Interaktionsstellen ausgewertet. Transformierte (GFP exprimierende) Zellen wurden unter Anregung mit blauem Licht identifiziert. Drei verschiedene Kategorien von transformierten Zellen konnten unterschieden werden:
- 1 Penetrierte Zellen, die ein leicht erkennbares Haustorium beinhalten. Eine Zelle mit mehr als einem Haustorium wurde als eine Zelle gewertet.
 2. Zellen, die durch ein Pilz-Appressorium zwar angegriffen wurden, aber kein Haustorium beinhalten. Eine Zelle die mehrfach von Bgh angegriffen wurden, aber kein Haustorium enthält, wurde als eine Zelle gewertet.
 3. Zellen die nicht durch Bgh angegriffen sind.
- Stomatazellen und Stomatanebenzellen wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Oberflächenstrukturen von Bgh wurden mittels Lichtmikroskopie oder Fluoreszenzfärbung des Pilzes mit 0,3 % Calcofluor (w/v in Wasser) für 30 sec analysiert. Die Entwicklung des Pilzes kann leicht durch Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit Calcofluor evaluiert werden. In B11-dsRNA transformierten Zellen entwickelt der Pilz zwar ein primäres und ein appressoriales Keimschlauch ("Germ-Tube") aber kein Haustorium. Haustoriumausbildung ist eine Vorbedingung für die Bildung einer Sekundärhyphae.
- Die Penetrationseffizienz (Penetrationsraten) errechnet sich als Anzahl der penetrierten Zellen durch Anzahl der attackierten Zellen multipliziert mit 100.

Die Penetrationseffizienz dient der Bestimmung des
Suszeptibilität von Zellen, die mit pGY-BI1 transfiziert sind im
Vergleich zu Zellen die mit einer Leervektorkontrolle
transformiert sind (Fig. 10). Es wurde beobachtet, dass die BI1
5 Überexpression die Penetrationshäufigkeit von Bgh signifikant
erhöht (Fig. 10). In sechs unabhängigen Experimenten bewirkte
die Überexpression in der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid eine
signifikante Erhöhung der durchschnittlichen
Penetrationseffizienz (PE) von 47 % auf 72 % (165 % der
10 Kontrollen) bei Zellen die BI1 überexprimieren im Vergleich zu
Zellen, die mit Leervektor transformiert wurden (Kontrolle)
(Fig. 10).

Ferner wurden epidermale Zellen der Bgh-resistenten *mlo5*-Gerste
mit dem BI1 Überexpressionskonstrukt pGY-1 wie oben beschrieben
transient transformiert. Der *mlo5*-Genotyp in einem Pallas bzw.
Ingrid Hintergrund zeigt eine geringfügige Anfälligkeit gegen
Bgh. In 7 unabhängigen Experimenten wurde in Kontrollpflanzen
(Transformation mit Leervektor und GFP-Vektor) eine
20 Penetrationseffizienz von minimal 0 bis maximal 11 % gefunden.
Überraschenderweise ergab eine BI1 Überexpression (pGY-BI1) eine
nahezu vollständige Rekonstitution der suszeptiblen Phänotyps,
d.h. es erfolgte ein nahezu kompletter Bruch der *mlo*-Resistenz.
Die durchschnittliche Penetrationseffizienz von Bgh auf Ingrid-
25 *mlo5* und Pallas-*mlo5* Blattsegmenten steigt von 4 % auf 23 %,
bzw. von 6 % auf 33 % (Fig. 11). Dies bedeutet einen relativen
Anstieg der Penetration auf 520 % bzw. 510 % der Kontrollen.
Desweiteren erhöhte die Überexpression von BI1 im Gerste cv
Manchuria die Anfälligkeit gegen das Weizenpathogen *Blumeria*
30 *graminis* f.sp. *tritici* in drei unabhängigen Experimenten von 0
bis 4 % auf 19 bis 27 % (Fig. 13).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen
mindestens einen biotischen oder abiotischen Streßfaktor in
Pflanzen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
- a) Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens ei-
nes Bax Inhibitor-1 (BI1) Proteins in mindestens einem
pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expressi-
on in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert
bleibt, und
- b) Auswahl der Pflanzen, bei denen im Vergleich zur Aus-
gangspflanze eine Resistenz gegen mindestens einen bio-
tischen oder abiotischen Streßfaktor besteht oder er-
höht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Streßfaktor ein pflanz-
liches Pathogen ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei der
Streßfaktor ein nekrotrophes oder hemibiotrophes Pathogen
ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das BI-1
Protein mindestens eine Sequenz umfaßt, die eine Homologie
von mindestens 50% aufweist zu mindestens einem BI1-
Konsensusmotiv ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- a) H(L/I)KXVY,
b) AXGA(Y/F)XH,
c) NIGG,
d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR,
e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL,
f) DP(S/G)(L/I)(I/L),
g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T),
h) YL(Y/F)LGG,
i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W, und
j) DTGX(I/V)(I/V)E.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das BI-
Protein kodiert wird durch ein Polypeptid, das mindestens
eine Sequenz umfaßt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

2

- a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 oder 32, und
- 5 b) Sequenzen, die eine Identität von mindestens 50% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 oder 32 aufweisen,
- 10 c) Sequenzen die mindestens eine Teilsequenz von mindestens 10 zusammenhängenden Aminosäureresten einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 oder 32 umfassen.
- 15 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Erhöhung der Proteinnmenge oder Funktion mindestens eines BII-Proteins durch rekombinante Expression des besagten BII-Proteins unter Kontrolle eines wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifischen Promotors realisiert wird.
- 20 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend
- 25 (a) stabile Transformation einer pflanzlichen Zelle mit einer rekombinanten Expressionskassette enthalten eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem gewebespezifischen Promotor, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die besagte das BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist.
- 30 (b) Regeneration der Pflanze aus der pflanzlichen Zelle, und
- 35 (c) Expression besagter für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in einer Menge und für eine Zeit hinreichend um eine Streß- und/oder Pathogenresistenz in besagter Pflanze zu erzeugen oder zu erhöhen.
- 40 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze aus den monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen ausgewählt ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe der monokotyledonen Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsa-

men oder Zuckerrohr.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Pflanze einen mlo-resistenten Phänotyp aufweist.
- 5
11. Polypeptidsequenz kodierend für BI1 Protein umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- 10
- a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30 oder 32,
- 15
- b) Sequenzen die eine Homologie von mindestens 90%, bevorzugt mindestens 95%, besonders bevorzugt mindestens 98% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30 oder 32 aufweisen, und
- 20
- c) Sequenzen die mindestens 10, bevorzugt mindestens 20, besonders bevorzugt mindestens 30 zusammenhängende Aminosäuren einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30 oder 32 umfassen.
12. Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Polypeptidsequenz gemäß Anspruch 11.
- 25
13. Rekombinante Expressionskassette enthalten eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem gewebespezifischen Promotor, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die besagte
- 30
- das BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist.
14. Rekombinante Expressionskassette nach Anspruch 13, wobei
- 35
- a) das BI1-Protein wie in einem der Ansprüche 4, 5 oder 11 definiert ist, und/oder
- b) der gewebespezifische Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe der wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifischen Promotoren.
- 40
15. Rekombinanter Vektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 13 oder 14.
- 45
16. Rekombinanter Organismus enthaltend mindestens eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 13 oder 14 und/oder

mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 15.

17. Rekombinanter Organismus nach Anspruch 17 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, nicht-menschlichen Tieren und Pflanzen.
18. Rekombinanter Organismus nach Anspruch 16 oder 17, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, Raps, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuß, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, Tagetes, Salat, Calendula, Melone, Kürbis und Zucchini.
19. Rekombinanter Organismus nach einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei der Organismus eine Pflanze ist, die zusätzlich einen mlo-resistenten Phänotyp aufweist.

Verfahren zur Erhöhung der Resistenz gegen Streßfaktoren in Pflanzen

Zusammenfassung

- 5 Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Streßfaktor in Pflanzen, bevorzugt gegen pflanzliche Pathogene, durch Erhöhung der Expression mindestens eines Bax-Inhibitor 1
- 10 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt. Die Erfindung betrifft ferner rekombinante Expressionskassetten und Vektoren, die eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines ge-
- 15 webespezifischen Promotors umfassen, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist. Die Erfindung betrifft ferner mit besagten Expressionskassetten oder Vektoren transformierte rekombinante Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder rekombinantes Vermehrungsgut, sowie die
- 20 Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

1

50

AtBI-1	(1)	-----MDAFSSFFDSQPGS---RSWSYDSLKNFRQISPAVQNHHLKR
BnBI-1	(1)	-----MDSFSSFFDSQPGS---RSWSYDSLKNLRQISPSVQNHHLKR
GmBI2	(1)	-----RLQAMDAFNSFFDS-----RNRWNYDTLKNFRQISPVVQNHHLKQ
GmBI3	(1)	ITKTIRFDSLFSMDTFFKSPSSSSSRWSYDTLKNFREISPLVQNHHLKL
HVBI-1	(1)	-----MDAFYSTS---SAAASGWGHDSLKNFRQISPAVQSHHLKL
NtBI-1	(1)	-----MESCTSFNFNSQSASS-RNRWSYDSLKNFRQISPFVQTHLKK
OsBI-1	(1)	-----MDAFYSTSSAYGAAASGWGYDSLKNFRQISPAVQSHHLKL
TaBI11	(1)	-----
TaBI18	(1)	-----FSGTFRNSRSDDFVLCELQRELPRCRDATLTV
TaBI5 neu	(1)	-----VAMPGR
ZmBI14	(1)	-----
ZmBI16	(1)	-----
ZmBI33	(1)	-----
ZmBI8	(1)	-----
Consensus	(1)	F S W YDSLKN R ISP VQ HLK

51

100

AtBI-1	(39)	VYLTLCALVASAFGAYLHVLWNIGGILTTIGCIGTMIWLLSCPPYEHQK
BnBI-1	(39)	VYLTLCALVASAFGAYLHVLWNIGGILTTIGCFGSMIWLLSCPPYEQK
GmBI2	(40)	VYFTLCFAVVAAVGAFLHVLWNIGGFLTTVACMGSSFWLLSTPPFEERK
GmBI3	(51)	VYFTLCFAVVAAVGAFLHVLWNIGGFLTTLASIGSMFWLLSTPPFEQK
HVBI-1	(37)	VYLTLCFALASSAVGAYLHIALNIGGMLTMLACVGTIAWMFVSVPYEERK
NtBI-1	(41)	VYLSLCCALVASAAGAYLHILWNIGGLTTLCGCVGSIVWLMATPLYEEQK
OsBI-1	(40)	VYLTLCVALAASAVGAYLHVALNIGGMLTMLGCVGSIWLFVSVPYEERK
TaBI11	(1)	-----
TaBI18	(33)	VYVIPIVGRIKSAAGAYLHIALNIGGMLTMLACIGTIAWMFVSVPYEERK
TaBI5 neu	(7)	RFRLTYALPGLICRGCLPAHCPEHWRDADNARVYRNHRLDVLGASLRGEE
ZmBI14	(1)	-----GSIWLFVSVPYEERK
ZmBI16	(1)	-----WNIGVRLTMLGCGSIDWLFVSVPYEERK
ZmBI33	(1)	-----WNIGGTLTMLGCVGSIWLFVSVPYEERK
ZmBI8	(1)	-----
Consensus	(51)	VY TLC AL ASA GAYLHV NIGG LT LGCIGSI WL S PVYEERK

101

150

AtBI-1	(89)	RLSLLFVSAVLEGASVGPLIKVAIDVDPSILITAFVGTAFVCFSAAM
BnBI-1	(89)	RLSLLFLSAVLEGASVGPLIKVAIDFDPSILITAFVGTAFVCFSGAAM
GmBI2	(90)	RVTLLMAASLFQGSIGPLIDLAIHIDPSLIFSFAVGTALAFACFSGAAL
GmBI3	(101)	RLSLLMASALFQGASIGPLIDLAFIDPGLIIGAFVATSLAFACFSAVAL
HVBI-1	(87)	RFGLLMGAALLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTAFVGCFSGAAL
NtBI-1	(91)	RIALLMAAALFKGASIGPLIELAIDFDPSIVIGAFVGCFAVGCFSAAAM
OsBI-1	(90)	RFGILLAAALLEGASVGPLIKLAVDFDSSILVTAFVGTAFVGCFTCAAI
TaBI11	(1)	-----AAI
TaBI18	(83)	RFGLLMGAALLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTAFVGCFSGAAL
TaBI5 neu	(57)	EVWAADGCSLLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTAFVGCFSGAAL
ZmBI14	(17)	RYWLLMAAALLEGASVGPLIKLAVEFDPSILVTAFVGTAFVGCFSGAAM
ZmBI16	(30)	RYGLLMAAALLEGASVGPLVKLAVEFDPSILVTAFVGTAFVGCFSGAAM
ZmBI33	(30)	RYGLLMAAALLEGASVGPLVKLAVEFDPSILVTAFVGTAFVGCFSGAPW
ZmBI8	(1)	-----VIDLSRILVTAFVGTAVAFACFSGAAL
Consensus	(101)	R LLMAAALLEGASVGPLI LAIDFDPSILVTAFVGTAFVGCFSGAAL

Fig. 1a

		151	200
AtBI-1	(139)	LARRREYLYLGGLLSSGLSMLMWLQFASSIFG-GSASIFKFELYFGLLIF	
BnBI-1	(139)	LARRREYLYLGGLLSSGLSMLMWLQFASSIFG-GSASIFKFELYFGLLIF	
GmBI2	(140)	VARRREYLYLGGLVSSGLSILLWLHFASSIFG-GSTALFKFELYFGLLVF	
GmBI3	(151)	VARRREYLYLGGLLSSWLSILMWLHSDSSLFG-GSTALFKFELYFGLLVF	
HVBI-1	(137)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFVTSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
NtBI-1	(141)	VARRREYLYLGGLLSSGLSILFWLHFASSIFG-GSMALFKFELYFGLLVF	
OsBI-1	(140)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFAASIFGHST-GSFMFEVYFGLLIF	
TaBI11	(4)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
TaBI18	(133)	IAKRREYLYLGGLLSSG-----LTLIL	
TaBI5 neu	(107)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
ZmBI14	(67)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFAASIFGHQSTSSFMFEVYFGLLIF	
ZmBI16	(80)	VARRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQLAASIF-GHSATSFMFVYFGLLIF	
ZmBI33	(80)	WQAR-EYLYLGGCSRSGSPSCSGCSSPPSS--ALRNSFMFEVYFGLLIL	
ZmBI8	(29)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHST-ATFMFEVYFGLLVF	
Consensus	(151)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFASSIFG S ASFMFEVYFGLLIF	
		201	250
AtBI-1	(188)	VGVMVVDTQEIIIEKAHLGDMDYVKHSLTLFTDFVAVFVRILIIIMLKNSAD	
BnBI-1	(188)	VGVMVVDTQDIIIEKAHLGDMDYVKHSLTLFTDFVAVFVRVLIIMLKNSAD	
GmBI2	(189)	VGVIIVDTQEIVERAHLGDLVDYKHALTLFTDLVAVFVRILVIMLKNSTE	
GmBI3	(200)	VGVIIVDTQEIIERAHFGDLVDYKHALTLFTDLAAIFVRILIIIMLKNSSE	
HVBI-1	(186)	LGYMVYDTQEIIERAHHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRLIIMLKNAAGD	
NtBI-1	(190)	VGIIIFDTQDIIIEKAHLGDLVDYKHALTLFTDFVAVFVRILIIIMLKNASD	
OsBI-1	(189)	LGYMVYDTQEIIERAHHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRLIIMLKNASD	
TaBI11	(53)	LGYMVYDTQEIIERAHHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRLIIMLKNAAGD	
TaBI18	(154)	L-----	
TaBI5 neu	(156)	LGYMVYDTQEIIERAHHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRLIIMLKNAAD	
ZmBI14	(117)	LGYMVYDTQEIVIERAHHG-----	
ZmBI16	(129)	LGYVVYDT-----	
ZmBI33	(127)	LG-----	
ZmBI8	(78)	LGYMVFDTQEIIERAHRGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRLIIMMKNQAQE	
Consensus	(201)	LGYMVYDTQEIIERAH GDMDYIKHALTLFTDFVAV VRILIIIMLKNA D	
		251	300
AtBI-1	(238)	KEEKKKKRRN-----GDVK-I-LYGCYRVWPL-RYLLALSIGDQTCF	
BnBI-1	(238)	KEDKKKKRRN-----D-KVRKKAK-SGCYVCFKK-----KRVG	
GmBI2	(239)	RNEKKKKRRD-----	
GmBI3	(250)	RNEKKKKRRD--ADRPTRAQASLQ-FSLWRIHN-----LFR-CWSLV-	
HVBI-1	(236)	KSEDKKKKRKG-----S-----	
NtBI-1	(240)	KEEKKKKRRN---CISGYSKTL-L-NLAFSCS---TSVDLRQVCC--FG	
OsBI-1	(239)	KSEEKKKKRRS-ELLFPLCT-EKTTAAIASTYYDRAALQLGPMVNTSSFA	
TaBI11	(103)	KSEDKKKKRRRS-----	
TaBI18	(155)	-----	
TaBI5 neu	(206)	KVGGQEEEEEEKS-----	
ZmBI14	(135)	-----	
ZmBI16	(137)	-----	
ZmBI33	(129)	-----	
ZmBI8	(128)	KSQDEKKRK-----	
Consensus	(251)	K E KKKRR	

Fig.1b

301 350

AtBI-1 (278) H-KG-SACFTSAQVPSSDCK-----LECCSSFHKLLFFKSL
 BnBI-1 (269) VISTDMIALVFFTCLEQFW-----QHTLRICVFLLVTPDCEWI
 GmBI2 (249) -----
 GmBI3 (288) LVSIVFAVMVNVRISEFKHLHMYLPIS-CVV-HHTLV-KKKKKKKKKKKKK
 HVBI-1 (248) -----
 NtBI-1 (279) NASD-AARLCYAAQCQGYGGT-MVLF----PKHTIK-HACLHYIDNLRVY
 OsBI-1 (287) FC-YGVNLLRFVVVVALQILACYMTRIFL-WWSR-SKRENTSSFATNLFA
 Consensus (301)

351 400

AtBI-1 (312) VLLIASYQAKNNVGK-----SCLNFLKCVHFRKKKKKKKKK-----
 BnBI-1 (307) SILKLC-KLSVGS-----
 GmBI2 (249) -----
 GmBI3 (335) KKKKKXXXXXXXXXXXXX--XXXXXGVCGLRYSRHSSNH-EGSLW-PGLC-
 HVBI-1 (248) -----
 NtBI-1 (322) YLFLLPFAVLGCS-LYS-FSVMLDHLLS-RLISHIDGRNENSHRRPNLFF
 OsBI-1 (334) FW-LMMILSPKKKK-----
 Consensus (351)

401 450

AtBI-1 (348) -----
 BnBI-1 (319) -----
 GmBI2 (249) -----
 GmBI3 (380) ACIDTVH-FGCNLCANS-YNVE-FI-EK-EEEEERLIG-PIAMCRVIWV
 HVBI-1 (248) -----
 NtBI-1 (369) TEAQL-----
 Consensus (401)

451 500

GmBI3 (424) ENT-LAV-KLLVPLCS--LAMCLL-W-MSGFLLNIFICIC--S-YIV-TS
 Consensus (451)

501 512

GmBI3 (464) FLGLKKEKKKKK
 Consensus (501)

Fig.1c

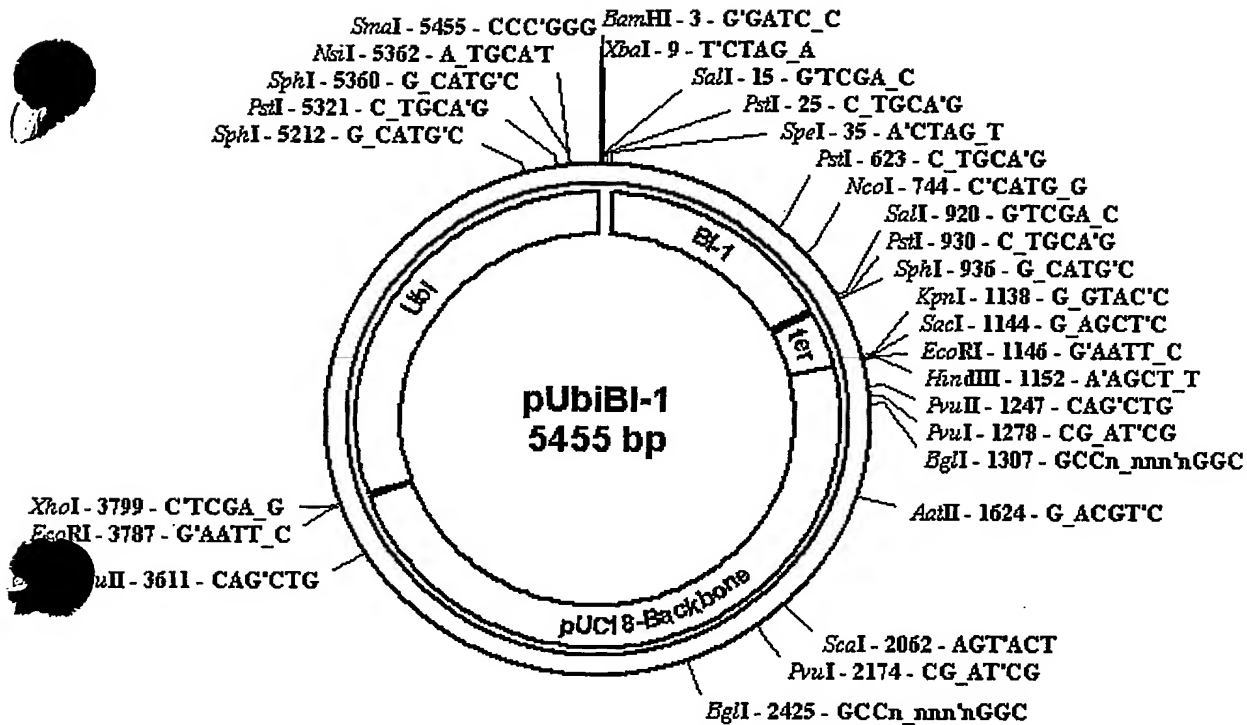


Fig.2

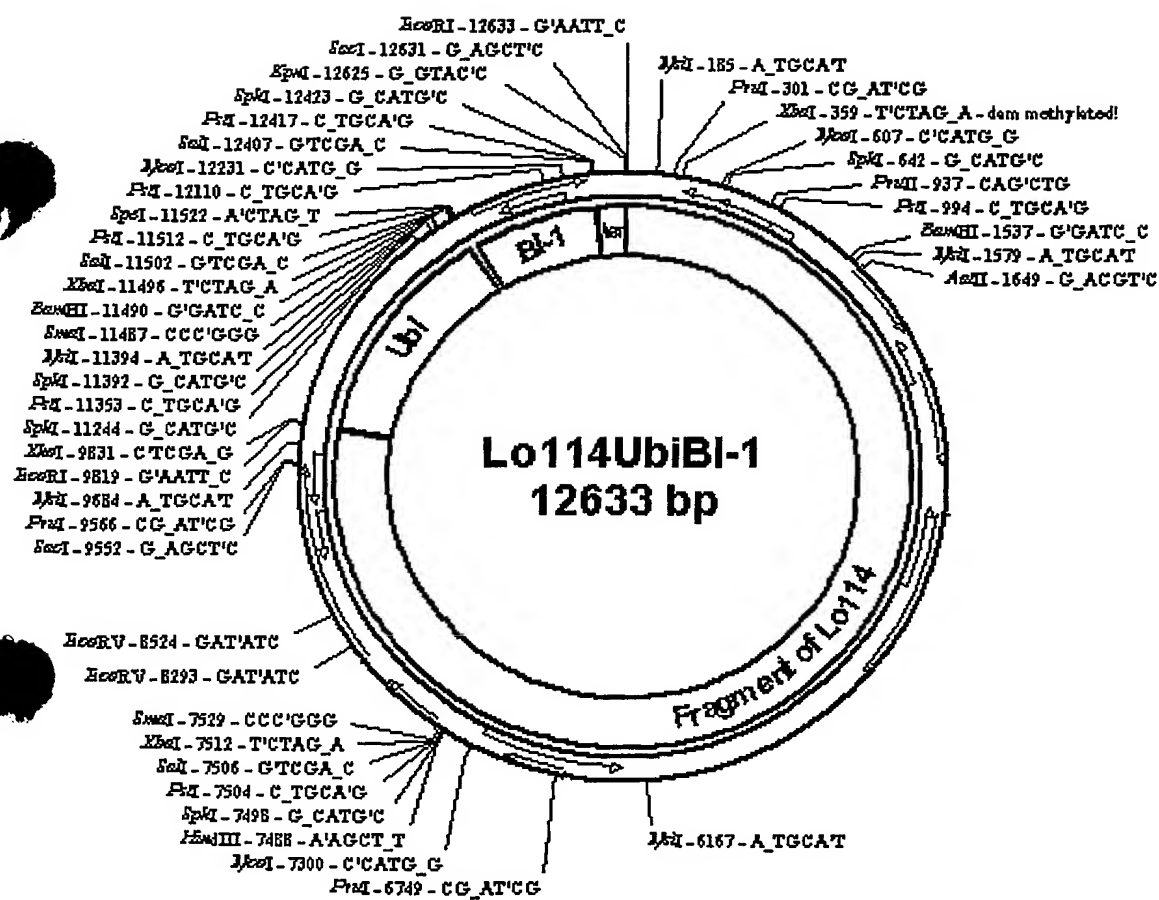


Fig.3

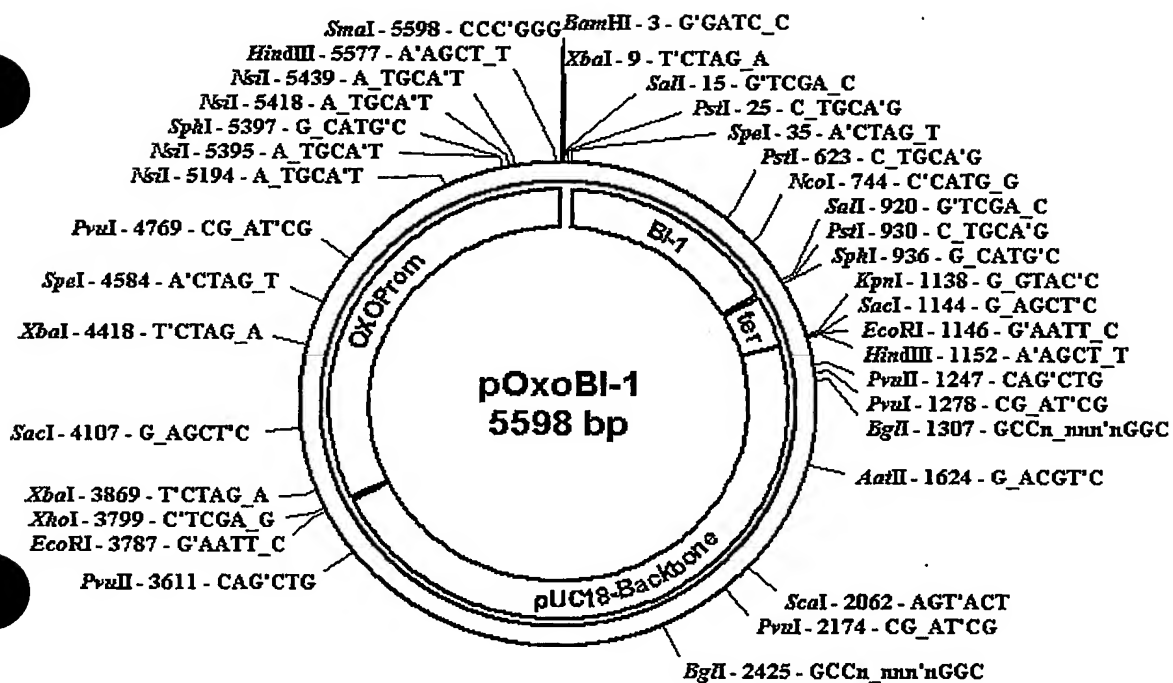


Fig.4

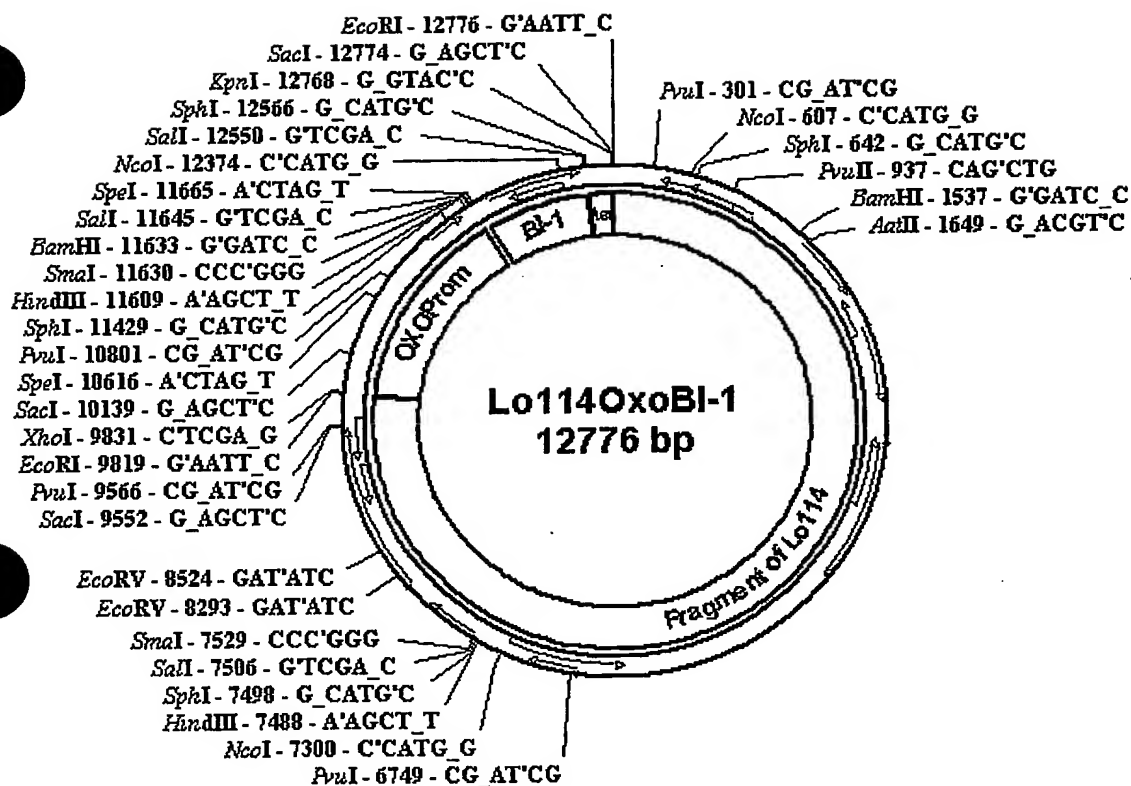


Fig.5

H. vul. MDAYSTSS---AAASGCHGHSLEKFRQISPAVCSHLKIVYLTLCFALASSAVGAYLHIA 57
O. sat. MDAYSTSSAYGAAASGCHGYDSLEKFRQISPAVCSHLKIVYLTLCVRLAASAVGAYLHVA 60
A. tha. MDAPSSFFDS-OPGSRSSSYDSLEKFRQISPAVONHLKRVYLTLCCLVASAFGAYLHV 59
H. sap. MNIDRKN-----FBAALKESHITPSTCCHLRVYASFALCHVAAAGAYVHMV 50

H. vul. LN-IGGELTHLACVGTIADMFVVPVYEE--RKRFGILHGAALLEGASVGPLIELAIDFD 113
O. sat. LN-IGGELTHLCCVGSIAMLFVVPVYEE--RKRFGILHGAALLEGASVGPLIELAIDFD 116
A. tha. UN-IGGELTTIGCTGTHIULLSCPPYEH--QKRLSLFVSADVLEGASVGPLIKVAIDVD 115
H. sap. THFIQAGLSALGSLILMIMLMAHSHETEQKRLGLLAGFDFITGVGLGPALEFCIAVN 110



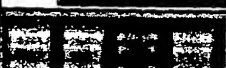


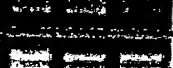
H. vul. PSILVTGTVGTATAFGCFSCAMIAKRREYLYLGCLSSGLSILLMLQVTSIFGHSSGS 173
O. sat. SSILVTAFVGTATAFGCFSCAMIAKRREYLYLGCLSSGLSILLMLQVTSIFGHSTGS 176
A. tha. PSILITAFVGTATAFVCFSAAMLAARREYLYLGCLSSGLSILLMLQVTSIFGGSASI 175
H. sap. PSILPTAFVGTAMIFTCTLSALYARRESYLYLGCLSSGLSILLMLQVTSIFGGSASI 169

H. vul. FMFEVYFGLLIFLGYNVYDTCEIIEEAHHGDDVYKHALTLFTDFVAVLVRLIIMLRNA 233
O. sat. FMFEVYFGLLIFLGYNVYDTCEIIEEAHHGDDVYKHALTLFTDFVAVLVRLIIMLRNA 236
A. tha. FKFEYFGLLIFVGYHVDTCETIEEAHLLGDDVYKHALTLFTDFVAVLVRLIIMLRNA 235
H. sap. EQANLYVGLVVMCGFVLVDTCETIEEAHLLGDDVYKHALTLFTDFVAVLVRLIIMLRNA 229

H. vul. GDSSEDKKKRKRGS 247
O. sat. SDSSEDKKKRKRGS- 249
A. tha. ADK-EEKKKRRN- 247
H. sap. KDK---KEKK--- 237

Fig. 6

rRNAs

	\emptyset	Pallas
	inoculated	
	\emptyset	BCP <i>Mla12</i>
	inoculated	
	\emptyset	BCP <i>mlo5</i>
	inoculated	
<div>0 1 4 7</div> <div>dai</div>		

BI-1







	Ø	Pallas
	inoculated	
	Ø	BCP <i>Mla12</i>
	inoculated	
	Ø	BCP <i>mlo5</i>
	inoculated	
<div>0 1 4 7</div> <div>dai</div>		

Fig.7

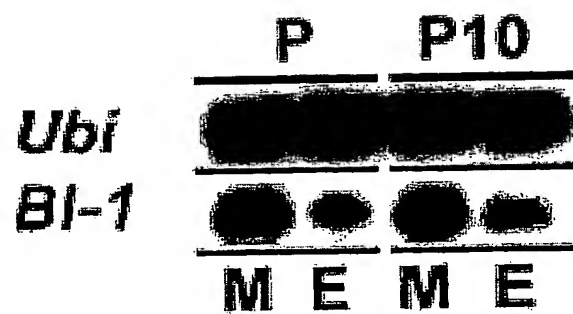


Fig. 8

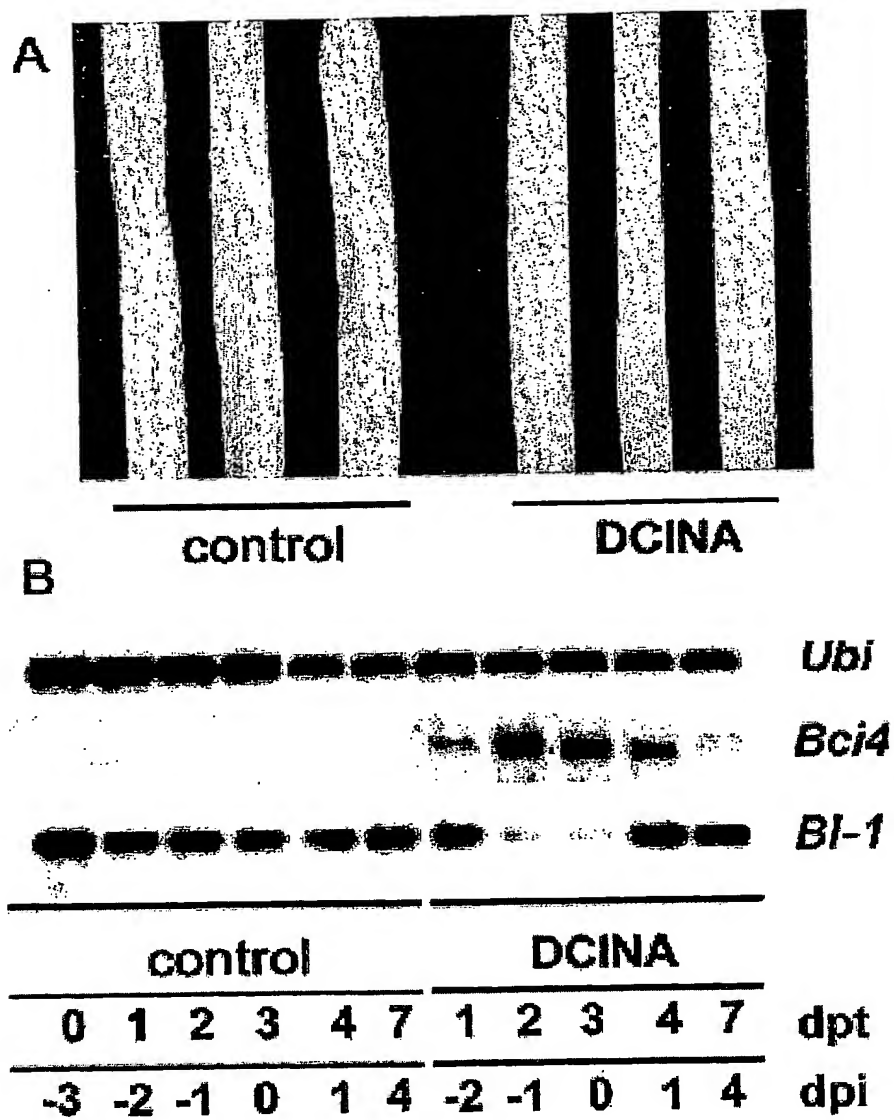


Fig. 9

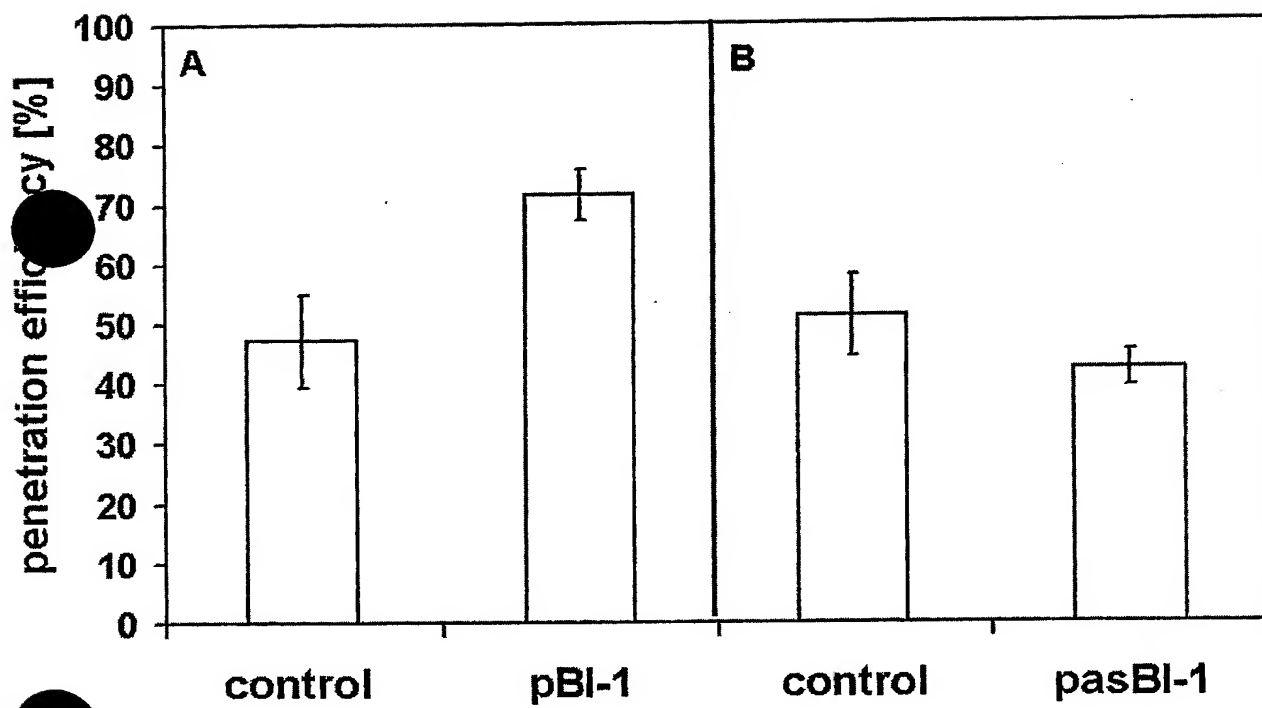


Fig.10

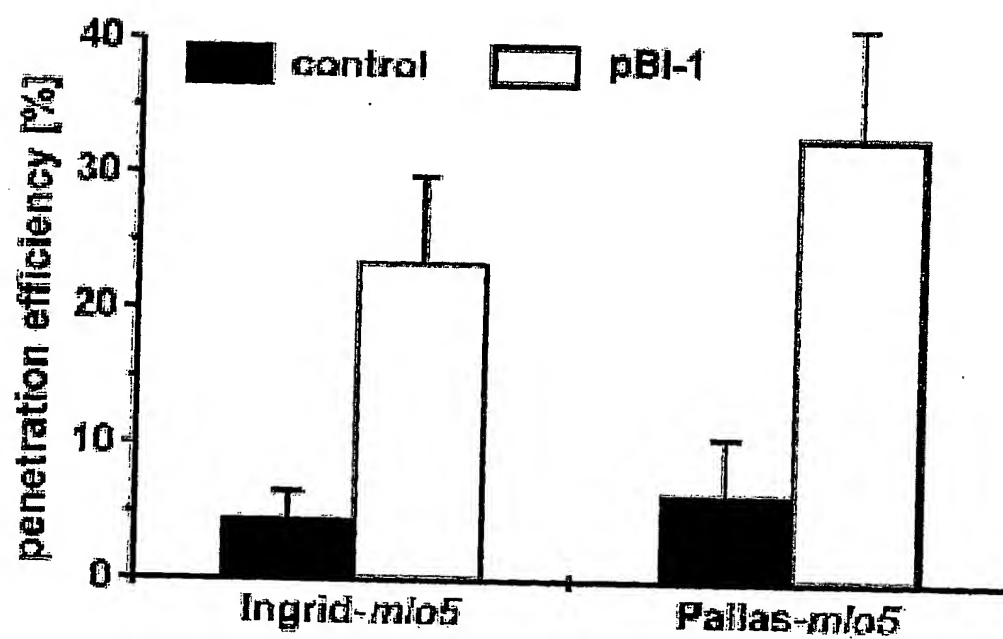


Fig.11

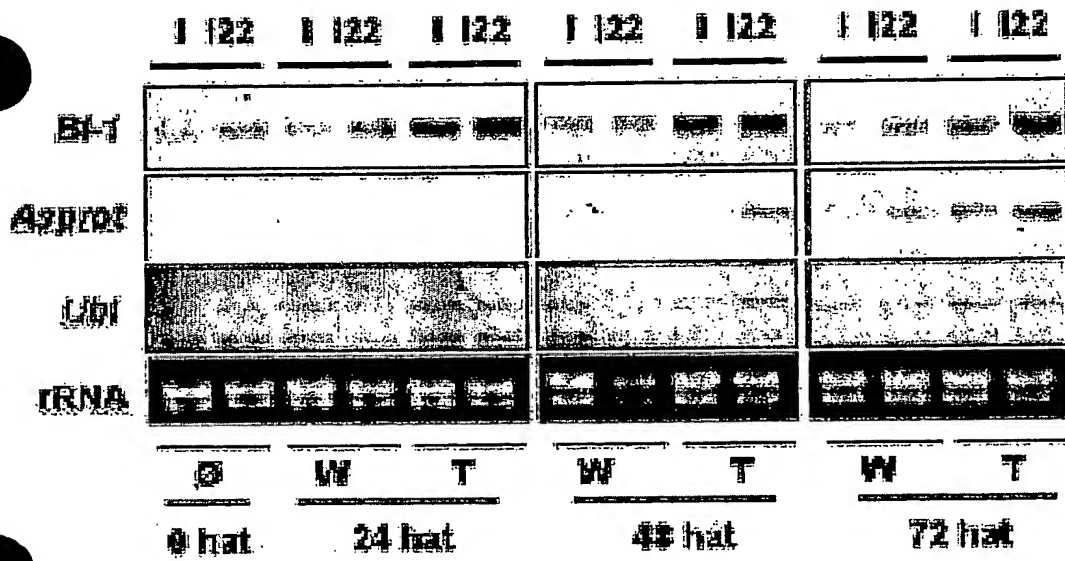


Fig.12

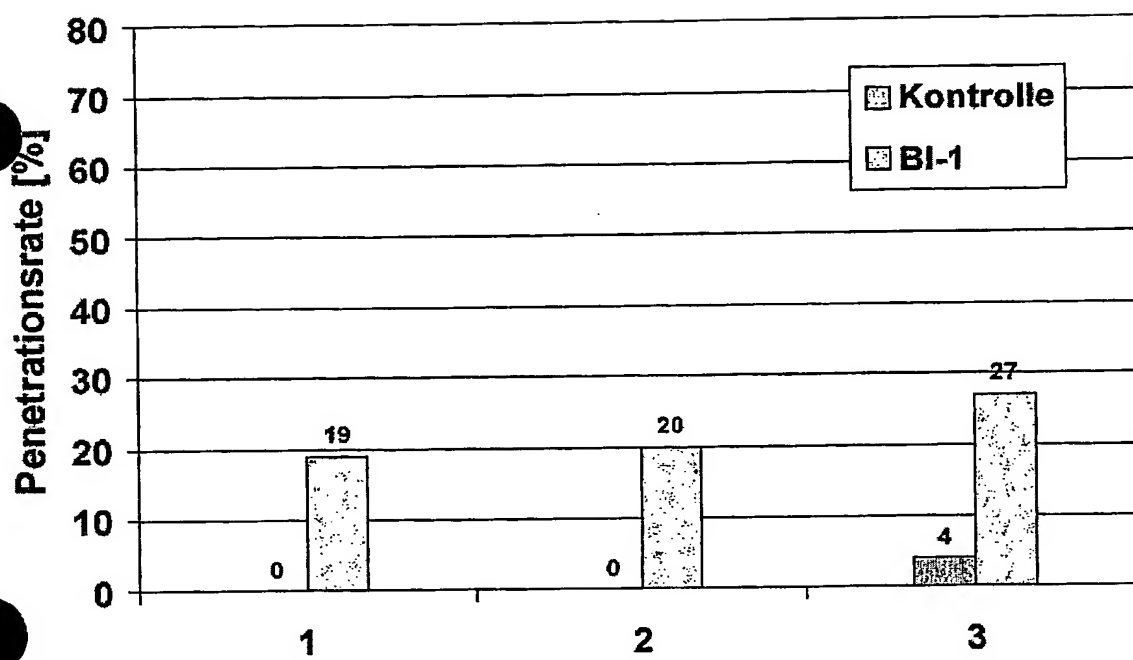


Fig.13

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH

5 <120> Verfahren zur Erhöhung der Resistenz gegen
Streßfaktoren in Pflanzen

<130> AE20030082

10 <140>
<141>

<160> 36

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 744

<212> DNA

20 <213> Hordeum vulgare

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(741)

5 <223> coding for BI1-protein

<400> 1

30	atg gac gcc ttc tac tcg acc tcg tcg gcg gcg gcg agc ggc tgg ggc	48
	Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly	
	1 5 10 15	
	cac gac tcc ctc aag aac ttc cgc cag atc tcc ccc gcc gtg cag tcc	96
	His Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser	
	20 25 30	
35	cac ctc aag ctc gtt tac ctg act cta tgc ttt gca ctg gcc tca tct	144
	His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser	
	35 40 45	
40	gcc gtg ggt gct tac cta cac att gcc ctg aac atc ggc ggg atg ctg	192
	Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu	
	50 55 60	
45	aca atg ctc gct tgt gtc gga act atc gcc tgg atg ttc tcg gtg cca	240
	Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro	
	65 70 75 80	
50	gtc tat gag gag agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc	288
	Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu	
	85 90 95	
	ctg gaa ggg gct tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt	336
	Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe	
	100 105 110	
55	gac cca agc atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc gcc ttt	384
	Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe	
	115 120 125	
60	ggg tgc ttc tct ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg	432
	Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu	
	130 135 140	
65	tac ctc ggt ggc ctg ctc tcg tct ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg	480
	Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu	
	145 150 155 160	

[AE-Nr.] REF/... Datum

[ggf. Fig/Seq]

2

5 cag ttt gtc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt 528
 Gln Phe Val Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe
 165 170 175
 gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg ggg tac atg gtg tac gac 576
 Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp
 180 185 190
 10 acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cat ggc gac atg gac tac atc 624
 Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile
 195 200 205
 15 aag cac gcc ctc acc ctc ttc acc gac ttt gtt gcc gtc ctc gtc cga 672
 Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg
 210 215 220
 20 gtc ctc atc atc atg ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag 720
 Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys
 225 230 235 240
 aag aag agg aag agg ggg tcc tga 744
 Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser
 245
 5 <210> 2
 <211> 247
 <212> PRT
 30 <213> Hordeum vulgare
 <400> 2
 Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly
 1 5 10 15
 35 His Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser
 20 25 30
 40 His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser
 35 40 45
 Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu
 50 55 60
 45 Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro
 65 70 75 80
 Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu
 85 90 95
 50 Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe
 100 105 110
 55 Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe
 115 120 125
 Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu
 130 135 140
 60 Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu
 145 150 155 160
 Gln Phe Val Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe
 165 170 175
 65 Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp

3

180 185 190

Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile
195 200 205

5 Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg
210 215 220

10 Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys
225 230 235 240

Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser
245

15

<210> 3
<211> 1067
<212> DNA
20 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(741)
25 <223> coding for BII-protein

<400> 3

30 atg gat gcg ttc tct tcc ttc ttc gat tct caa cct ggt agc aga agc 48
Met Asp Ala Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser
1 5 10 15

tgg agc tat gat tct ctt aaa aac ttc cgt cag att tct cca gcc gtt 96
Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val
20 25 30

35 cag aat cat ctt aaa cgg gtt tat ttg acc tta tgt tgt gct ctt gtg 144
Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val
35 40 45

40 gcg tct gcc ttt gga gct tac ctc cat gtg ctc tgg aat atc gcc ggt 192
Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly
50 55 60

45 att ctt aca acg att gga tgt att gga act atg att tgg ctc ctt tca 240
Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Ile Gly Thr Met Ile Trp Leu Leu Ser
65 70 75 80

50 tgt cct cct tat gaa cac caa aaa agg ctt tct ctt ctg ttt gtg tct 288
Cys Pro Pro Tyr Glu His Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Val Ser
85 90 95

gct gtt ctt gaa ggt gct tct gtt ggc ccc ttg atc aaa gtg gca att 336
Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Ile
100 105 110

55 gat gtt gac cca agc atc ctt atc act gca ttt gtt gga act gcg ata 384
Asp Val Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile
115 120 125

60 gcg ttt gtc tgt ttc tca gca gca gca atg tta gca aga cgc agg gag 432
Ala Phe Val Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu
130 135 140

65 tat ctc tac ctt gga gga ctg ctt tca tct ggc ttg tct atg cta atg 480
Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met
145 150 155 160

	5	tgg ctc cag ttt gcc tct tca atc ttt ggt ggc tct gca tct atc ttt Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe 165 170 175	528
		aag ttt gag ttg tac ttt gga ctt ttg atc ttt gtg gga tac atg gtg Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val 180 185 190	576
	10	gtg gac aca caa gag att ata gaa aag gca cac ctc ggt gac atg gac Val Asp Thr Gln Glu Ile Ile Gln Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp 195 200 205	624
	15	tat gta aaa cat tcg ttg acc ctt ttc act gac ttt gta gct gtg ttt Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe 210 215 220	672
	20	gtt cgg att ctc atc ata atg ttg aag aac tca gca gat aaa gaa gag Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Glu 225 230 235 240	720
	25	aag aag aag aaa agg aga aac tgaggggatg taaagtaaatt ttaactttat Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn 245	771
	30	ggtgtgtatc gtgtgtggcc actttgaaga tattacttgt tagcactctc tattgtgtgac cagacatgtt tccactaaaa aggatctgct tgtttcactt ctgcacaagt accatcttca gattgtaaatt gactcgagtg ttgttcttct tttcataaac ttttgttctt taagagtttg gttctactga ttgcatctta ccaagctaag aataatgtag gaaaaatgata atcctgttta aattttctaa aatgtgtgca tttcagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa	831 891 951 1011 1067
	35	<210> 4 <211> 247 <212> PRT <213> Arabidopsis thaliana	
	40	<400> 4 Met Asp Ala Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser 1 5 10 15 Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val 20 25 30 Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val 35 40 45 Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly 50 55 60 Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Ile Gly Thr Met Ile Trp Leu Leu Ser 65 70 75 80 Cys Pro Pro Tyr Glu His Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Val Ser 85 90 95 Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Ile 100 105 110 Asp Val Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile 115 120 125	
	45		
	50		
	55		
	60		
	65		

5

Ala Phe Val Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu
130 135 140

5 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met
145 150 155 160

Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe
165 170 175

10 Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val
180 185 190

Val Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp
195 200 205

15 Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe
210 215 220

20 Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Glu
225 230 235 240

Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn
245

25

<210> 5
<211> 1160
<212> DNA
30 <213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(747)
35 <223> coding for BII-protein

<400> 5
40 atg gag tct tgc aca tcg ttc ttc aat tca cag tcg gcg tct cgc 48
Met Glu Ser Cys Thr Ser Phe Phe Asn Ser Gln Ser Ala Ser Ser Arg
1 5 10 15

aat cgc tgg agt tac gat tct ctt aag aac ttc cgc cag atc tct ccc 96
Asn Arg Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro
20 25 30

45 ttt gtt caa act cat ctc aaa aag gtc tac ctt tca tta tgt tgt gct 144
Phe Val Gln Thr His Leu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Leu Cys Cys Ala
35 40 45

50 tta gtt gct tcg gct gct gga gct tac ctt cac att ctt tgg aac att 192
Leu Val Ala Ser Ala Ala Gly Ala Tyr Leu His Ile Leu Trp Asn Ile
50 55 60

55 ggt ggc tta ctt acg aca ttg gga tgt gtg gga agc ata gtg tgg ctg 240
Gly Gly Leu Leu Thr Thr Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Val Trp Leu
65 70 75 80

60 atg gcg aca cct ctg tat gaa gag caa aag agg ata gca ctt ctg atg 288
Met Ala Thr Pro Leu Tyr Glu Glu Gln Lys Arg Ile Ala Leu Leu Met
85 90 95

gca gct gca ctg ttt aaa gga gca tct att ggt cca ctg att gaa ttg 336
Ala Ala Ala Leu Phe Lys Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Glu Leu
100 105 110

65 gct att gac ttt gac cca agc att gtg atc ggt gct ttt gtt ggt tgt 384

6

Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile Val Ile Gly Ala Phe Val Gly Cys
 115 120 125

5 gct gtg gct ttt ggt tgc ttc tca gct gct gcc atg gtg gca agg cgc 432
 Ala Val Ala Phe Gly Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Val Ala Arg Arg
 130 135 140

10 aga gag tac ttg tat ctt gga ggt ctt ctt tca tct ggt ctc tct atc 480
 Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile
 145 150 155 160

15 ctt ttc tgg ttg cac ttc gcg tcc tcc att ttt ggt ggt tct atg gcc 528
 Leu Phe Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Met Ala
 165 170 175

ttg ttc aag ttc gag gtt tat ttt ggg ctc ttg gtg ttt gtg ggc tat 576
 Leu Phe Lys Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr
 180 185 190

20 atc att ttt gac acc caa gat ata att gag aag gca cac ctt ggg gat 624
 Ile Ile Phe Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp
 195 200 205

25 ttg gac tac gtg aag cat gct ctg acc ctc ttt aca gat ttt gtt gct 672
 Leu Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala
 210 215 220

30 gtt ttt gtg cga ata tta atc ata atg ctg aag aat gca tcc gac aag 720
 Val Phe Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys
 225 230 235 240

gaa gag aag aag aag aag agg aga aac taatgcataa gcggttattc 767
 Glu Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn
 245

35 aaagactctg taactctaga atctggcatt ttcttggtca taaacttctg tagaccttcg 827
 acaagtatgt tgtaaatagt ttggtaacgc ctcagattaa gctgcgaggc tctgttatgc 887

40 cgcattgcaa tgtggttatg gtggtacata gatggttttg tttccgaagc ataccatcaa 947
 ataacatgca tgtttacct atatcgataa cctacgagtg tactacttat ttctgctccc 1007

45 ttttgctgtg ttaggttggt catgattgta tagttgattt tccgttatgt tagaccatct 1067
 tctttcttga cgtttaattt ctcatattga tgggagaaat gaaaattcac accgtcgccc 1127
 caacttggtt aagactgagg cgcaattgta gtt 1160

50 <210> 6
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

55 <400> 6
 Met Glu Ser Cys Thr Ser Phe Phe Asn Ser Gln Ser Ala Ser Ser Arg
 1 5 10 15

60 Asn Arg Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro
 20 25 30

Phe Val Gln Thr His Leu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Leu Cys Cys Ala
 35 40 45

65 Leu Val Ala Ser Ala Ala Gly Ala Tyr Leu His Ile Leu Trp Asn Ile

7

[illegible]

5	ggg atg ttg act atg ctc ggg tgc gtg ggg agc atc gcc tgg ttg ttc 240 Gly Met Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe 80 65
	tcg gtg cct gtc ttt gag gag agg aag agg ttt ggg att ctc ttg gcc 288 Ser Val Pro Val Phe Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Ile Leu Leu Ala 95 85
10	gct gcc ctg ctg gaa ggg gct tca gtt ggg cct ctg atc aag ctt gct 336 Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala 110 100
15	gta gac ttt gac tca agc att ctc gta aca gca ttt gtt gga act gcc 384 Val Asp Phe Asp Ser Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala 125 115
20	att gca ttt ggg tgc ttc act tgc gct gcc atc gtt gcc aag cgt agg 432 Ile Ala Phe Gly Cys Phe Thr Cys Ala Ala Ile Val Ala Lys Arg Arg 140 130
25	gag tac ctc tac ctt ggt ggt ttg ctc tct tct ggc ctc tcc atc ctg 480 Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu 160 145
	ctc tgg ctg cag ttt gcc gca tcc atc ttt ggc cac tcc acc ggc agc 528 Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile Phe Gly His Ser Thr Gly Ser 175 165
30	ttc atg ttt gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg ggg tac atg 576 Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met 190 180
35	gtg tat gac acg cag gag atc atc gag agg gct cac cac ggt gac atg 624 Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met 205 195
40	gac tac atc aag cac gca ctc acc ctc ttc act gac ttc gtg gcc gtc 672 Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val 220 210
45	ctt gtc cgg atc ctc gtc atc atg ctc aag aac gcg tct gac aag tcg 720 Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ser 240 225
	gag gag aag aag agg aag aag agg tct tgagagcttc tcttcccgct 767 Glu Glu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser 245
50	ttgcacataa gaaaaaacca ccgcggctat tgctcttacg tattatgaca gagccgcact 827 tcaactgggt tttatggtga atacaagttc ttttgcattt tgttgatacg gtgtgaatct 887
55	tctcagggttt gtcgtcgtag tagcttttga aatactagca tgctacatga cacggatctt 947 tctgtaatgg tggtcgctt gatcgaaacg tgaaaacaca tcttcatttg cgactaattt 1007 gtttgccttt tggtgattga tgatgatcct ttccccaaaa aaaaaaaaaa 1056
60	<210> 8 <211> 249 <212> PRT <213> <i>Oryza sativa</i>
65	<400> 8

9

Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Ala Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 5 Gly Trp Gly Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala
 20 25 30
 Val Gln Ser His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Val Ala Leu
 35 40 45
 10 Ala Ala Ser Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Ala Leu Asn Ile Gly
 50 55 60
 Gly Met Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe
 65 70 75 80
 15 Ser Val Pro Val Phe Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Ile Leu Leu Ala
 85 90 95
 20 Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala
 100 105 110
 Val Asp Phe Asp Ser Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala
 115 120 125
 25 Ile Ala Phe Gly Cys Phe Thr Cys Ala Ala Ile Val Ala Lys Arg Arg
 130 135 140
 Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu
 145 150 155 160
 30 Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile Phe Gly His Ser Thr Gly Ser
 165 170 175
 35 Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met
 180 185 190
 Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met
 195 200 205
 40 Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val
 210 215 220
 Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ser
 225 230 235 240
 45 Glu Glu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser
 245
 50
 <210> 9
 <211> 973
 <212> DNA
 <213> Brassica napus
 55
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(741)
 <223> coding for BII-protein
 60
 <400> 9
 atg gat tca ttc tgc tcc ttc ttc gat tct caa cct ggt agc aga agc 48
 Met Asp Ser Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser
 1 5 10 15
 65 tgg agc tat gat tct ctc aaa aac ctc cgt cag att tct ccc tcc gtc 96

[illegible]

5. <210> 10
<211> 247
<212> PRT
<213> Brassica napus

10. <400> 10
Met Asp Ser Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser
1 5 10 15
Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Leu Arg Gln Ile Ser Pro Ser Val
20 25 30
15. Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val
35 40 45
Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly
50 55 60
20. Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Phe Gly Ser Met Ile Trp Leu Leu Ser
65 70 75 80
5. Cys Pro Pro Tyr Glu Gln Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ser
85 90 95
Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Val
100 105 110
30. Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile
115 120 125
Ala Phe Ile Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu
130 135 140
35. Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met
145 150 155 160
40. Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe
165 170 175
Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val
180 185 190
45. Val Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp
195 200 205
50. Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe
210 215 220
Val Arg Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Asp
225 230 235 240
55. Lys Lys Lys Arg Arg Arg Asn
245

60. <210> 11
<211> 747
<212> DNA
<213> Glycine max

65. <220>
<221> CDS
<222> (1)..(744)

12

<223> coding for BII-protein

<400> 11

5	cga ttg caa gca atg gac gcc ttc aat tcc ttc ttc gat tca aga aac	48
	Arg Leu Gln Ala Met Asp Ala Phe Asn Ser Phe Phe Asp Ser Arg Asn	
	1 5 10 15	
10	cga tgg aat tac gat act ctc aaa aac ttc cgt cag att tct ccg gtc	96
	Arg Trp Asn Tyr Asp Thr Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Val	
	20 25 30	
15	gtg cag aat cac ctg aag cag gtt tat ttt act ctg tgt ttt gcc gtg	144
	Val Gln Asn His Leu Lys Gln Val Tyr Phe Thr Leu Cys Phe Ala Val	
	35 40 45	
20	gtt gct gcg gct gtc ggg gct tac ctt cat gtc ctc ttg aac att ggg	192
	Val Ala Ala Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Leu Asn Ile Gly	
	50 55 60	
25	ggt ttt ctt act aca gtg gca tgc atg gga agc agc ttt tgg tta ctc	240
	Gly Phe Leu Thr Thr Val Ala Cys Met Gly Ser Ser Phe Trp Leu Leu	
	65 70 75 80	
30	tcc aca cct cct ttt gaa gag agg aag agg gtg act ttg ttg atg gcc	288
	Ser Thr Pro Pro Phe Glu Glu Arg Lys Arg Val Thr Leu Leu Met Ala	
	85 90 95	
35	gca tca ctg ttt cag ggt tcc tct att gga ccc ttg att gat ttg gct	336
	Ala Ser Leu Phe Gln Gly Ser Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala	
	100 105 110	
40	att cat atc gat cca agc ctt atc ttt agt gca ttt gtg gga aca gcc	384
	Ile His Ile Asp Pro Ser Leu Ile Phe Ser Ala Phe Val Gly Thr Ala	
	115 120 125	
45	ttg gcc ttt gca tgc ttc tca gga gca gct ttg gtt gct agg cgt agg	432
	Leu Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg	
	130 135 140	
50	gag tac ctg tac ctt ggt ggc ttg gtt tct tct gga ttg tcc atc ctt	480
	Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Val Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu	
	145 150 155 160	
55	ctc tgg ttg cac ttt gct tct tcc atc ttt gga ggc tca aca gct ctc	528
	Leu Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Thr Ala Leu	
	165 170 175	
60	ttt aag ttt gag ttg tac ttt ggg ctt ttg gtg ttt gta ggt tac att	576
	Phe Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Ile	
	180 185 190	
65	gta gta gac acc caa gaa ata gtt gag agg gca cac ttg ggc gat ctg	624
	Val Val Asp Thr Gln Glu Ile Val Glu Arg Ala His Leu Gly Asp Leu	
	195 200 205	
70	gac tat gta aag cat gcc ttg acc ttg ttt acc gat ttg gtc gca gtt	672
	Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Val Ala Val	
	210 215 220	
75	ttt gtc cgg att ctt gtt att atg ttg aag aat tgc act gag agg aat	720
	Phe Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ser Thr Glu Arg Asn	
	225 230 235 240	
80	gag aag aaa aag aag aga aga gat tga	747
	Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asp	
	245	

5 <210> 12
<211> 248
<212> PRT
<213> Glycine max

10 <400> 12
Arg Leu Gln Ala Met Asp Ala Phe Asn Ser Phe Phe Asp Ser Arg Asn
1 5 10 15
Arg Trp Asn Tyr Asp Thr Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Val
20 25 30
15 Val Gln Asn His Leu Lys Gln Val Tyr Phe Thr Leu Cys Phe Ala Val
35 40 45
20 Val Ala Ala Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Leu Asn Ile Gly
50 55 60
Gly Phe Leu Thr Thr Val Ala Cys Met Gly Ser Ser Phe Trp Leu Leu
65 70 75 80
25 Ser Thr Pro Pro Phe Glu Glu Arg Lys Arg Val Thr Leu Leu Met Ala
85 90 95
Ala Ser Leu Phe Gln Gly Ser Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala
100 105 110
30 Ile His Ile Asp Pro Ser Leu Ile Phe Ser Ala Phe Val Gly Thr Ala
115 120 125
Leu Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg
130 135 140
35 Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Val Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu
145 150 155 160
40 Leu Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Thr Ala Leu
165 170 175
Phe Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Ile
180 185 190
45 Val Val Asp Thr Gln Glu Ile Val Glu Arg Ala His Leu Gly Asp Leu
195 200 205
Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Val Ala Val
210 215 220
50 Phe Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ser Thr Glu Arg Asn
225 230 235 240
55 Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asp
245

60 <210> 13
<211> 1510
<212> DNA
<213> Glycine max

65 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(777)

14

<223> coding for BI-1 protein

<400> 13

5	atc acg aaa act ata cga ttc gat tcc ttg ttt tcg atg gac act ttc Ile Thr Lys Thr Ile Arg Phe Asp Ser Leu Phe Ser Met Asp Thr Phe	48
	1 5 10 15	
10	ttc aag tcc cca tct tct tct tct tcg aga agc cgc tgg agt tac gat Phe Lys Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Arg Ser Arg Trp Ser Tyr Asp	96
	20 25 30	
15	act ctc aag aat ttc cgc gag atc tct ccg ctc gtt cag aat cac atc Thr Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Leu Val Gln Asn His Ile	144
	35 40 45	
20	aaa ctg gtt tat ttt acg tta tgt tgc gct gtg gtg gct gct gct gtt Lys Leu Val Tyr Phe Thr Leu Cys Cys Ala Val Val Ala Ala Ala Val	192
	50 55 60	
25	gga gct ttc ctt cat gtt ctg tgg aac att ggc ggt ttt ctc acc acg Gly Ala Phe Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr	240
	65 70 75 80	
30	ttg gct tcc att ggg agc atg ttt tgg ttg cta tct aca ccc cct ttt Leu Ala Ser Ile Gly Ser Met Phe Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro Phe	288
	85 90 95	
35	gaa gag caa aag agg ttg tct ctg ttg atg gct tcg gcc ctg ttt cag Glu Glu Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Met Ala Ser Ala Leu Phe Gln	336
	100 105 110	
40	ggt gct tcc att gga cct ctg att gat ttg gct ttt gcc att gat cct Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Phe Ala Ile Asp Pro	384
	115 120 125	
45	ggc ctt atc att ggc gca ttt gtg gca act tct ttg gct ttt gct tgc Gly Leu Ile Ile Gly Ala Phe Val Ala Thr Ser Leu Ala Phe Ala Cys	432
	130 135 140	
50	ttt tct gca gta gcc tta gtt gca agg cga agg gag tac ctc tac ctt Phe Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu	480
	145 150 155 160	
55	ggt ggt ttg ctt tct tct tgg ctt tcc att ctt atg tgg ttg cac tct Gly Gly Leu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Ile Leu Met Trp Leu His Ser	528
	165 170 175	
60	gat tcc tct ctc ttt ggg ggc tca att gca ctc ttc aag ttt gag ctg Asp Ser Ser Leu Phe Gly Gly Ser Ile Ala Leu Phe Lys Phe Glu Leu	576
	180 185 190	
65	tac ttt ggg ctt ttg gtg ttt gtg ggc tac gtt ata gta gac act caa Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Val Ile Val Asp Thr Gln	624
	195 200 205	
70	gaa att att gaa agg gct cac ttt ggt gac ctg gat tat gtg aag cat Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Phe Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His	672
	210 215 220	
75	gca ttg aca ttg ttc act gat ttg gct gca atc ttt gtg cga att ctt Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Ala Ala Ile Phe Val Arg Ile Leu	720
	225 230 235 240	
80	att ata atg ttg aag aat tca tct gag aga aat gag aag aag aag aaa Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ser Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys	768
	245 250 255	

15

agg aga gat tagtaggctg accgaccgac tcgagctcag gcttctctac 817
Arg Arg Asp

5 agtaatttag tttgtggaga atacataatt agctgttttag atgatgttgg tcccttgtgt 877
agttagtttag ctatgtgttt gctgtaattg taaatgtcag gatttctttt aaacatcttc 937
atattgtattt gccaatatca taatgtgtcg tataacatca taccttggtt taaaaaaaaa 997
10 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaann nnnnnnnnnn 1057
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngg tgtttgtggg ctacgttata 1117
15 gtagacactc aagtaatcat tgagagggtc cactttgttg acctggatta tgtaagcat 1177
gcattgacac tgttactga tttggctgca atctttgtgc gaattcttaa tataatgttg 1237
aataattcat ctaagagaaa tgagaagaag aggaggagag attaataagg tgaccgattg 1297
20 ctatgtgttag agtaatttgg tttgtagaga atacataatt agctgttttag aagttgttgg 1357
tccccttgtg tagttagtag ttagctatgt gtttgctgta atggtaaag tcaggatttc 1417
25 ttttaaacat tttcatatgt atttgctaata aatcataata tatagtataa acatcattcc 1477
ttggtttaa aaaagaaaa aaaaaaaaaaaa aaa 1510

30 <210> 14
<211> 259
<212> PRT
<213> Glycine max

35 <400> 14
Ile Thr Lys Thr Ile Arg Phe Asp Ser Leu Phe Ser Met Asp Thr Phe
1 5 10 15

40 Phe Lys Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Arg Ser Arg Trp Ser Tyr Asp
20 25 30

Thr Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Leu Val Gln Asn His Ile
35 40 45

45 Lys Leu Val Tyr Phe Thr Leu Cys Cys Ala Val Val Ala Ala Ala Val
50 55 60

Gly Ala Phe Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr
65 70 75 80

50 Leu Ala Ser Ile Gly Ser Met Phe Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro Phe
85 90 95

55 Glu Glu Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Met Ala Ser Ala Leu Phe Gln
100 105 110

Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Phe Ala Ile Asp Pro
115 120 125

60 Gly Leu Ile Ile Gly Ala Phe Val Ala Thr Ser Leu Ala Phe Ala Cys
130 135 140

Phe Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu
145 150 155 160

65 Gly Gly Leu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Ile Leu Met Trp Leu His Ser

16

	165	170	175	
	Asp Ser Ser Leu Phe Gly Gly Ser Ile Ala Leu Phe Lys Phe Glu Leu			
	180	185	190	
5	Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Val Ile Val Asp Thr Gln			
	195	200	205	
10	Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Phe Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His			
	210	215	220	
	Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Ala Ala Ile Phe Val Arg Ile Leu			
	225	230	235	240
15	Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ser Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys			
	245	250	255	
	Arg Arg Asp			
20				
	<210> 15			
	<211> 651			
	<212> DNA			
	<213> Triticum aestivum			
	<220>			
	<221> CDS			
30	<222> (1)..(651)			
	<223> coding for BI-1 protein			
	<400> 15			
35	gtc gca atg ccg ggt cga cga ttt cgt ctg acc tat gct ttg cct ggc			48
	Val Ala Met Pro Gly Arg Arg Phe Arg Leu Thr Tyr Ala Leu Pro Gly			
	1 5 10 15			
	ctc atc tgc cgt ggg tgc tta cct gca cat tgc cct gaa cat tgg cgg			96
40	Leu Ile Cys Arg Gly Cys Leu Pro Ala His Cys Pro Glu His Trp Arg			
	20 25 30			
	gat gct gac aat gct cgc gtg tat cgg aac cat cgc ctg gat gtt ctc			144
	Asp Ala Asp Asn Ala Arg Val Tyr Arg Asn His Arg Leu Asp Val Leu			
	35 40 45			
45	ggt gcc agt cta cga gga gag gaa gag gtt tgg gct gct gat ggg tgc			192
	Gly Ala Ser Leu Arg Gly Glu Glu Glu Val Trp Ala Ala Asp Gly Cys			
	50 55 60			
50	agc ctc ctg gaa ggg gct tca gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata			240
	Ser Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile			
	65 70 75 80			
	gac ttt gac cca agt atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc			288
55	Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile			
	85 90 95			
	gcc ttc ggg tgc ttc tct ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag			336
60	Ala Phe Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu			
	100 105 110			
	tac ctg tac ctc ggt ggt ctg ctc tcc tcc ggc ctg tgc atc ctg ctc			384
	Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu			
	115 120 125			
65	tgg ctg cag ttt gcc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc			432

17

Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe
 130 135 140
 5 atg ttt gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg gga tac atg gtg 480
 Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val
 145 150 155 160
 10 tac gac acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cac ggc gac atg gat 528
 Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp
 165 170 175
 15 tac atc aag cac gcg ctc acc ctc ttc acc gac ttc gtc gcc gtt ctc 576
 Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu
 180 185 190
 gtc cgc gtc ctc atc atc ttg ctc aag aac gca gcg gac aag gtc gga 624
 Val Arg Val Leu Ile Ile Leu Leu Lys Asn Ala Ala Asp Lys Val Gly
 195 200 205
 20 ggc caa gaa gag gag gaa gag aag tcc 651
 Gly Gln Glu Glu Glu Glu Lys Ser
 210 215
 25 <210> 16
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 30 <400> 16
 Val Ala Met Pro Gly Arg Arg Phe Arg Leu Thr Tyr Ala Leu Pro Gly
 1 5 10 15
 35 Leu Ile Cys Arg Gly Cys Leu Pro Ala His Cys Pro Glu His Trp Arg
 20 25 30
 Asp Ala Asp Asn Ala Arg Val Tyr Arg Asn His Arg Leu Asp Val Leu
 35 40 45
 40 Gly Ala Ser Leu Arg Gly Glu Glu Glu Val Trp Ala Ala Asp Gly Cys
 50 55 60
 45 Ser Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile
 65 70 75 80
 Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile
 85 90 95
 50 Ala Phe Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu
 100 105 110
 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu
 115 120 125
 55 Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe
 130 135 140
 60 Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val
 145 150 155 160
 Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp
 165 170 175
 65 Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu
 180 185 190

18

Val Arg Val Leu Ile Ile Leu Leu Lys Asn Ala Ala Asp Lys Val Gly
 195 200 205

Gly Gln Glu Glu Glu Glu Lys Ser
 210 215

5

10 <210> 17
 <211> 412
 <212> DNA
 <213> Zea mays

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (3)..(410)
 <223> coding for BII-protein

20 <400> 17
 tt gtt att gac ttg gat tgc agg att ctc gtc act gcg ttc gtc ggg 47
 Val Ile Asp Leu Asp Ser Arg Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly
 1 5 10 15

25 acc gca gtt gct ttt gca tgc ttc tct ggc gct gcc atc atc gcc aag 95
 Thr Ala Val Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys
 20 25 30

30 cgc agg gaa tac ctg tac ctc ggc ggt ctg ctt tca tct ggc ctc tcc 143
 Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser
 35 40 45

35 att ctt ctc tgg ctg cag ttt gct act tca atc ttt ggc cac acc agc 191
 Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Thr Ser
 50 55 60

40 gcg acc ttc atg ttt gag ctc tac ttt ggc ctc ctg gtt ttc ctg gga 239
 Ala Thr Phe Met Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Val Phe Leu Gly
 65 70 75

40 tat atg gtg ttt gac acc cag gag atc atc gag agg gcg cac cgt ggg 287
 Tyr Met Val Phe Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Arg Gly
 80 85 90 95

45 gac atg gac tac atc aag cac gcg ctg act ctc ttc acc gac ttt gtt 335
 Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val
 100 105 110

50 gcg gtt ctt gtt cga atc ctt gtc atc atg atg aag aat gca cag gag 383
 Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Met Lys Asn Ala Gln Glu
 115 120 125

55 aaa tcc caa gac gag aag aag agg aag aa 412
 Lys Ser Gln Asp Glu Lys Lys Arg Lys
 130 135

60 <210> 18
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Zea mays

65 <400> 18
 Val Ile Asp Leu Asp Ser Arg Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr
 1 5 10 15
 Ala Val Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg

19

	20	25	30	
	Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile			
	35	40	45	
5	Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Thr Ser Ala			
	50	55	60	
10	Thr Phe Met Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Leu Gly Tyr			
	65	70	75	80
	Met Val Phe Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Arg Gly Asp			
	85	90	95	
15	Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala			
	100	105	110	
	Val Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Met Lys Asn Ala Gln Glu Lys			
	115	120	125	
20	Ser Gln Asp Glu Lys Lys Arg Lys			
	130	135		
25	<210> 19			
	<211> 345			
	<212> DNA			
	<213> Triticum aestivum			
30	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (1)..(342)			
35	<400> 19			
	gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg tac ctc ggt ggc ctg			48
	Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu			
	1	5	10	15
40	ctc tcc tcc ggc ctg tgc atc ctg ctc tgg ctg cag ttt gcc acg tcc			96
	Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser			
	20	25	30	
45	atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt gag gtt tac ttt ggc			144
	Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly			
	35	40	45	
50	ctg ttg atc ttt ctg gga tac atg gtg tac gac acg cag gag atc atc			192
	Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile			
	50	55	60	
55	gag agg gcg cac cac ggc gac atg gac tac atc aag cac gcg ctc acc			240
	Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr			
	65	70	75	80
60	ctc ttc acc gac ttt gtc gcc gtc ctc gtc cgg atc ctc atc atc atg			288
	Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Ile Ile Met			
	85	90	95	
65	ctc aag aac gca ggc gac aag tgc gag gac aag aag aag agg aag agg			336
	Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Arg Lys Arg			
	100	105	110	
	agg tcc tga			345
	Arg Ser			

20

<210> 20
 <211> 114
 <212> PRT
 5 <213> Triticum aestivum

 <400> 20
 Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu
 1 5 10 15
 10 Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser
 20 25 30
 15 Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly
 35 40 45
 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile
 50 55 60
 20 Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr
 65 70 75 80
 Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Ile Ile Met
 85 90 95
 25 Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Arg Lys Arg
 100 105 110
 30 Arg Ser

 35 <210> 21
 <211> 403
 <212> DNA
 <213> Zea mays

 40 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(402)
 <223> coding for B11-protein

 45 <400> 21
 ggc agc atc gcc tgg ctc ttc tgc gtg ccc gtc tac gag gag agg aag 48
 Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys 15
 1 5 10
 50 agg tac tgg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggg gcg tgc gtt 96
 Arg Tyr Trp Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val 20 25 30
 55 gga ccc ctc atc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg 144
 Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val 35 40 45
 60 aca gcg ttc gtg ggg act gcc att gcg ttc gcg tgc ttc tct tgc gcg 192
 Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Cys Ala 50 55 60
 65 gcc atg gtg gcc aag cgc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggg ctg ctc 240
 Ala Met Val Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu 65 70 75 80
 65 tct tct ggc ctc tcc atc ctg ctc tgg ctg cag ttc gcc gcc tcc atc 288
 Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile

21

	85	90	95	
5	ttc ggc cac caa tcc act agc agc ttc atg ttt gag gtc tac ttt ggg Phe Gly His Gln Ser Thr Ser Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly 100 105 110			336
10	ctg ctc atc ttc ctg ggc tac atg gtg tac gac acg cag gag gtc atc Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Val Ile 115 120 125			384
15	gag agg gcg cac cac ggc g Glu Arg Ala His His Gly 130			403
20	<210> 22 <211> 134 <212> PRT <213> Zea mays			
25	<400> 22 Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys 1 5 10 15			
30	Arg Tyr Trp Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val 20 25 30 Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val 35 40 45			
35	Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Cys Ala 50 55 60 Ala Met Val Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu 65 70 75 80			
40	Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile 85 90 95			
45	Phe Gly His Gln Ser Thr Ser Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly 100 105 110 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Val Ile 115 120 125			
50	Glu Arg Ala His His Gly 130			
55	<210> 23 <211> 410 <212> DNA <213> Zea mays			
60	<220> <221> CDS <222> (3)..(410) <223> coding for B11-protein			
65	<400> 23 gc tgg aac atc ggc gtg agg ctg aca atg ctc ggt tgc atc ggc agc Trp Asn Ile Gly Val Arg Leu Thr Met Leu Gly Cys Ile Gly Ser 1 5 10 15			47
	atc gac tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag agg tat			95

22

Ile Asp Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr
 20 25 30

5 ggg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggc gct tcg gtc gga ccc 143
 Gly Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro
 35 40 45

10 ctc gtc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg acg gcg 191
 Leu Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala
 50 55 60

15 ttc gtg ggg act gcc atc gcg ttc gcg tgc ttc tcc ggc gcg gcc atg 239
 Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met
 65 70 75

20 gtg gcc agg cgc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggc ctg ctc tcg tcg 287
 Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser
 80 85 90 95

25 ggg ctc tcc atc ctg ctc tgg ctg cag ctc gcc gcc tcc atc ttc ggc 335
 Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ala Ala Ser Ile Phe Gly
 100 105 110

30 cac tcc gca acc agc ttc atg ttc gag gtc tac ttc ggc ctg ctc atc 383
 His Ser Ala Thr Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile
 115 120 125

35 ttc ctg ggc tac gtg gtg tac gac acg 410
 Phe Leu Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr
 130 135

<210> 24
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Zea mays

40 <400> 24
 Trp Asn Ile Gly Val Arg Leu Thr Met Leu Gly Cys Ile Gly Ser Ile
 1 5 10 15

45 Asp Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr Gly
 20 25 30

50 Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu
 35 40 45

55 Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe
 50 55 60

60 Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Val
 65 70 75 80

65 Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly
 85 90 95

60 Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ala Ala Ser Ile Phe Gly His
 100 105 110

65 Ser Ala Thr Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe
 115 120 125

Leu Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr
 130 135

23

<210> 25
 <211> 463
 <212> DNA
 5 <213> Triticum aestivum

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(462)
 10 <223> coding for BI1-protein

 <400> 25
 ttc tca ggt acg ttc cgc aat tcc cgg agc gac gat ttc gtg ctc tgc 48
 Phe Ser Gly Thr Phe Arg Asn Ser Arg Ser Asp Asp Phe Val Leu Cys
 15 1 5 10 15

 gaa ctt cag cga gag ctc ccc cga tgc cgg gac gca acc ttg acg gtc 96
 Glu Leu Gln Arg Glu Leu Pro Arg Cys Arg Asp Ala Thr Leu Thr Val
 20 20 25 30

 gta tac gtg atc cca ata gtg ggc cga ata aaa tct gcc gcg ggt gct 144
 Val Tyr Val Ile Pro Ile Val Gly Arg Ile Lys Ser Ala Ala Gly Ala
 35 40 45

 25 tac ctg cac att gcc ctg aac atc ggt ggg atg ctg aca atg ctt gcg 192
 Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu Thr Met Leu Ala
 50 55 60

 30 tgt atc gga acc att gcc tgg atg ttc tct gtg cca gtc tat gag gag 240
 Cys Ile Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu
 65 70 75 80

 agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc ctg gaa ggg gct 288
 Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala
 35 85 90 95

 tgc gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt gac cca agc atc 336
 Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile
 40 100 105 110

 ctc gtg aca ggg ttt gtt gga acc gcc atc gcc ttt ggg tgc ttc tct 384
 Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Gly Cys Phe Ser
 115 120 125

 45 ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg tac ctc gga ggc 432
 Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly
 130 135 140

 50 ctg ctc tcc tcc ggc ctg acg atc ctg ctc t 463
 Leu Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ile Leu Leu
 145 150

 <210> 26
 55 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

 <400> 26
 60 Phe Ser Gly Thr Phe Arg Asn Ser Arg Ser Asp Asp Phe Val Leu Cys
 1 5 10 15

 Glu Leu Gln Arg Glu Leu Pro Arg Cys Arg Asp Ala Thr Leu Thr Val
 20 25 30
 65 Val Tyr Val Ile Pro Ile Val Gly Arg Ile Lys Ser Ala Ala Gly Ala

24

	35	40	45	
	Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu Thr Met Leu Ala			
	50	55	60	
5	Cys Ile Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu			
	65	70	75	80
	Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala			
10		85	90	95
	Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile			
		100	105	110
15	Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Gly Cys Phe Ser			
		115	120	125
	Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly			
		130	135	140
20	Leu Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ile Leu Leu			
	145	150		
25	<210> 27			
	<211> 388			
	<212> DNA			
	<213> Zea mays			
30	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (3)..(386)			
	<223> coding for BI1-protein			
35	<400> 27			
	tc tgg aac atc ggc ggg acg ctg aca atg ctc ggt tgc gtc ggc agc			47
	Trp Asn Ile Gly Gly Thr Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser			
	1	5	10	15
40	atc gcc tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag agg tat			95
	Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr			
		20	25	30
45	ggg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggc gct tcg gtc gga ccc			143
	Gly Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro			
		35	40	45
	ctc gtc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg acg gcg			191
50	Leu Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala			
		50	55	60
	ttc gtg ggg act gcc atc gcg ttc gcg tgc ttc tcc ggc gcg cca tgg			239
	Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Pro Trp			
55		65	70	75
	tgg cag gcc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggc tgc tct cgt cga ggc			287
	Trp Gln Ala Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Cys Ser Arg Arg Gly			
		80	85	90
60	tct cca tcc tgc tct ggc tgc agc tcg ccg cct cca tct tcg gca ctc			335
	Ser Pro Ser Cys Ser Gly Cys Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Ala Leu			
		100	105	110
65	cgc aac agc ttc atg ttc gag gtc tac ttc ggg ctg ctc att ctt ctg			383
	Arg Asn Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Leu Leu			

25

115

120

125

ggc ta
Gly

388

5

<210> 28

<211> 128

<212> PRT

10 <213> Zea mays

<400> 28

Trp Asn Ile Gly Gly Thr Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile
1 5 10 15

15

Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr Gly
20 25 30

20

Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu
35 40 45Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe
50 55 60

25

Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Pro Trp Trp
65 70 75 80

30

Gln Ala Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Cys Ser Arg Arg Gly Ser
85 90 95Pro Ser Cys Ser Gly Cys Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Ala Leu Arg
100 105 110

35

Asn Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Leu Leu Gly
115 120 125

40

<210> 29

<211> 1737

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

45

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1737)

<223> patatin promotor

50

<400> 29

aagcttatgt tgccatatag agtagtttgt gatggtatac ttcataaaact ttaacttatg 60
ttaaatattgt aatgataaaa tttttattgt aaattaaaaa ttacttataa aattgggcat 120
tataacatat gaaagacaaa ttgtgttaca tattttactt ttgactttaa tatgaatatt 180
tcaatttaaa tcattgtttt attttctctt tctttttaca ggtataaaaag gtgaaaattg 240
aagcaagatt gattgcaagc tatgtgtcac cacgttattg atactttgga agaaattttt 300
acttatatgt ctttgttttag gagtaaatatt tgatatgttt tagttagatt ttcttgtcat 360
ttatgcttta gtataatttt agttattttt attatatgat catgggtgaa ttttgataca 420
aatatttttg tcattaaata aattaattta tcacaacttg attactttca gtgacaaaaa 480
atgtattgtc gtagtaccct tttttgttga atatgaataa ttttttttat tttgtgacaa 540
ttgtaattgt cactacttat gataaatattt agtgacatat atgtcgtcgg taaaagcaaa 600
cactttcagt gacaaaataa tagatttaac cacaaaatta ttaacctttt ttataataat 660
aaatttatcc ctaatttata catttaagga caaagtattt tttttatata taaaaaatag 720
tcttttagtga cgatcgtagt gttgagtccta gaaatcataa tgttgaatct agaaaaatct 780
catgcagtggt aaaataaacc tcaaaaagga cgttcagtc atagaggggg tgtatgtgac 840
accccaacct cagcaaaaga aaacctccct tcaacaagga catttgcggt gctaacaat 900
ttcaagtcct acacacata tattttattat ataatactaa taaagaatag aaaaggaaag 960
gtaaacatca ttaaatcgtc tttgtatatt ttttagtgaca actgattgac gaaatctttt 1020

26

tcgtcacaca aaatttttag tgacgaaaca tgatttatag atgatgaaat tatttgtccc 1080
tcataatcta atttgttgta gtgacatta ctctttgtt tgttttattt gtcattgtag 1140
tccattaaaa aaaaatatct ctcttcttat gtacgtgaat gggttgaacg gatctattat 1200
5 ataatactaa taaagaatag aaaaaggaaa gtgagtgagg ttccgaggag agaactctgtt 1260
taatatcaga gtcgatcatg tgtcaatttt atcgatatga ccctaacttc aactgagttt 1320
aaccaattcc gataaggcga gaaatatcat agtattgagt ctgaaaaaat ctcatgtagt 1380
gtggggtaaa cctcagcaag gacgttgagt ccatagaggg ggggtgatgt gacacccaa 1440
cctcagcaaa agaaaacctc ccctcaagaa ggacatttgc ggtgctaaac aatttcaagt 1500
ctcatcacac atatatatat attatataat actataaat aatagaaaaa ggaaaggtaa 1560
10 acatcactaa cgacagtgc ggtgcaaac gagtgaggta ataaacatca ctaactttta 1620
ttggttatgt caaactcaaa gtaaaatttc tcaacttgtt tacgtgccta tatataccat 1680
gcttgttata tgctcaaagc accaacaataa tttaaaaaca ctttgaacat ttgcaaa 1737

15 <210> 30
<211> 1317
<212> DNA
<213> *Triticum aestivum*

20 <220>
<221> promoter
<222> (1)..(1317)
<223> germin 9f-3.8 gene promotor

35 <400> 30
gaattcaagc tatcactctc gaaccaagca cattgatgta aggtatcatt ggattccaga 60
tgctcgtgagt tccaagttgc tgaaacttga gaagatccat accgacgaca atgggttcaga 120
tatgatgacc aagatattgc gaaaataagaa gctacaagca tgttgcaagg tagcggggcat 180
ggcgggtgccc ccatcatgag tcggaggggg agatttggtg ggatatcctc ctcatgtggg 240
30 ttctgaggag atgaccattt gaggcctttt agccagccca aagagggtgca gaagcccaact 300
acccattagg gttatgacct agggtcattt tggactttgc acatgagtgg atgggggatgc 360
tttaccctcc atccagcagc caccaccaag ggtgacgaaa atcagttcat cctccaagag 420
agaagaagag agaaaaccaa gagagcaagg gaagaagagg aagattgaag gaagaagaaa 480
agggagctcc tccccaaggt tgtgatggtc catatccact atcttgtctc cttcaaaactt 540
35 cggttccacc atcttttgta agattgttct aatccctagt tcttgagccc caaatcttgt 600
tgtgttcac ccaagattcag aaatcttgat gtatgagatc ctctagtgtc gtctagagaa 660
gaatttggtt tatcccacat ttgataatag tggaaagagg tttgggtggc ttcggcccac 720
ggtttttccc ctcaagttga ggggttttcc acgtaaaatc tgggtgtctc ttgttgatgc 780
ttgggtgtgt ccagaaactt actcctacca caagacacta ggggcccagt cttttgggaa 840
40 attctcccag aattgacctt ctcccagct tctcccagaa ttgtcactcc attttctctt 900
acaattccta gctagttaag gtctaattag tttaggaattg taaaaaata tcaagtggca 960
attctgggag aagctgggga gggggtcaat tctggaagaa ttgcccataa gaactggccc 1020
taggctgagg agtgctctgc ctgctgctta acattttctg cctccatata tgttgttgca 1080
tatgtttcct tccgtgctaa gcaacgattc ttgagttagt acatgatgtg gtgctgagat 1140
45 tactttgttt tcgctgcagt tatcagttaa ccacaagtgc atttgctgct taattcccaa 1200
caatatgcca cccgcaactc atccaccata gctcagcagc aaccaccaat gccatagaca 1260
ctctcggtaa acaacctgta gcttatcagt ctgctaaagc gtgctgcata gcaagca 1317

50 <210> 31
<211> 959
<212> DNA
<213> *Arabidopsis thaliana*

55 <220>
<221> promoter
<222> (1)..(959)
<223> CAB-2 promotor

60 <400> 31
gaattcatgt gtgagggcaa ttagtgattg taaaaataaa atttgtgttt gtaaaaaact 60
tttactgtcg aaattattta ggggtgatgaa aaaatcagta aactacgaat gatagcttaa 120
agagtttcta tcaagtgat tgaggaatag tttgttgcaa attaaacctc taacaaaatg 180
ttttctgttg tgggttttca tctctacaaa ttttgaattt tatgatgaat tagaaagata 240
65 gaatgagtta ctttagattt taaaaggttg ttcaagttta caaacagat tactagaatc 300
atgattaaaa atttacaagc tacatatgtt ctaaaccaat gatgttgaa ataccagatg 360

27

5 atagtttttc agtgtttgaa caatcaattg gatagttttt atgttttctgc aaaatatgca 420
aataatcagt gtttttgagt ctttgcatth tgatttataa gcaaaaacaa ctgagtttca 480
agggttaaatt aattacatta ttcatgagat ttatcagggt agtggataaa ctgacaatgg 540
aatcaatggt attgtaaatt ggtagtgatg ttggacttct aatgttactc tctatgatgt 600
ttcgggtcatc ggtatcacac tatctttact ttattttaaa ggaaagatca cacaaataag 660
ttatctctat tcagaactat taagctgctt ccaaaagact tgcaacatgt ggtctcgaaa 720
tgctttggct gcaatgaaaa aatcatagca aaagctagtg gactagagac tggcacataa 780
gaatagtaaa cgtaaaaacc aaaatctcaa aaatccaatg agtaagaga tatagattac 840
ttcatagata acaaacgtta ctcgcaattt tcctatataa tccaacccta cctaaccatt 900
10 ttcaatcact ctactcaca agtttagtcac caaaaaaaa aaaaacacaa aaagtttca 959

15 <210> 32
<211> 445
<212> DNA
<213> Zea mays

20 <220>
<221> promoter
<222> (1)..(445)
<223> PPCZml promoter

25 <400> 32
gaattccaaa aatagacacg gcaattttct tattcacaga aaaaatataa ctacaactaa 60
tccccaaagtc cacagggatt agggatcaat ctgcaaaaact aaaagtactt ttacagttgt 120
acttggcatg agtcatgtga ccatgagaga ggcgcacggt tcagcaaagc aacataaaat 180
tctccaaacg ggccccgcca cacacgatca ccatcacccc cgggctcccc acccagtaca 240
aatagacacg cacactccca actccccacc catctccgcc gcgcacacgc cccaatcagc 300
caatctcctc ctctcctctc gctctcagac gagcagcggg tgccatcact ctccacttcc 360
30 cagcccgctg cggggctcgc agggcgacaga gaattgtctg tgccgcccggg tgggaatttg 420
attcggctcgg attccgtgcg ccgcg 445

35 <210> 33
<211> 5455
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

40 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant
expression vector pUbiBI-1

45 <400> 33
ggggatcctc tagagtgcac ctgcaggcgg ccgcactagt gattaggatt ccaacgcgag 60
ccaggacaag cgaggaacct tgcgtgcgag gcgaggccgc cccgctccga ttcgattcga 120
cgcgccaggc caggcgaggc gatggacgcc ttctactcga cctcgctcggc ggccggcgagc 180
ggctggggcc acgactccct caagaacttc cgccagatct ccccgcgctg gcagtcaccac 240
ctcaagctcg tttacctgac tctatgcttt gcactggcct catctgccgt ggggtgcttac 300
ctacacattg cctgaacat cggcgggatg ctgacaatgc tcgcttgtgt cggaactatc 360
50 gcctggatgt tctcgggtgc agtctatgag gagaggaaga ggtttgggct gctgatgggt 420
gcagccctcc tgggaaggggc ttcggttgga cctctgattg agcttgccat agactttgac 480
ccaagcatcc tcgtgacagg gtttgtcggg accgccatcg cctttgggtg ctctctctggc 540
gccgccatca tcgcccaagg cagggagtag ctgtacctcg gtggcctgct ctgctctggc 600
ctgtcgatcc tgctctggct gcagtttgtc acgtccatct ttggccactc ctctggcagc 660
55 ttcatgtttg aggtttactt tggcctgttg atcttctctg ggtacatggt gtacgacacg 720
caggagatca tcgagagggc gcacctggc gacatggact acatcaagca cgccctcacc 780
ctcttcaccg actttgttgc cgtcctcgtc cgagtcctca tcatcatgct caagaacgca 840
ggcgacaagt cggaggacaa gaagaagagg aagagggggg cctgaacgtw tctcccgcac 900
60 atgtagatac cgtcaccgcg tcgacctgca ggcatgcccg ctgaaatcac cagtctctct 960
ctacaaatct atctctctca taataatgtg tgagtgttc ccagataagg gaattagggt 1020
tcttataggg ttctgctcat gtgttgagca tataagaaac ccttagtatg tatttgtatt 1080
tgtaaaatc ttctatcaat aaaatttcta attctataaa ccaaaatcca gtgggtaccg 1140
agctcgaatt caagcttggc actggccgctc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct 1200
ggcggttacc aacttaatcg ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc 1260
65 gaagaggccc gcaccgatcg ccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc 1320
ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat atgggtgcact 1380

28

	ctcagtagaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagc	cccacacccc	gccaacacccc	1440
	gctgacgcgc	cctgacgggc	ttgtctgctc	ccggcatccg	cttacagaca	agctgtgacc	1500
	gtctccggga	gctgcatgtg	tcagagggtt	tcaccgtcat	caccgaaacg	cgcgagacga	1560
	aagggcctcg	tgatagccct	atTTTTatag	gttaatgtca	tgataataat	ggtttcttag	1620
5	acgtcagggt	gcacttttcg	gggaaatgtg	cgcggaaccc	ctatTTgttt	atTTTTctaa	1680
	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgtc	tcaataatat	1740
	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	ctTTTTtgcg	1800
	gcattttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	agatgtgtaa	1860
	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	taagatcctt	1920
10	gagagttttc	gccccgaaga	acgtttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	tctgctatgt	1980
	ggcgcggtat	tatcccgat	tgacgcccgg	caagagcaac	tcggtcgccc	catacactat	2040
	tctcagaatg	acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	ggatggcatg	2100
	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataacactgc	ggccaactta	2160
	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	catgggggat	2220
15	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccc	gagctgaatg	aagccatacc	aaacgacgag	2280
	cgtagacacca	cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaaactatt	aactggcgaa	2340
	ctacttactc	tagcttcccg	gcaacaatta	atagactgga	tgaggcgga	taaagtgtga	2400
	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	agctggttta	ttgctgataa	atctggagcc	2460
	ggtagagcgtg	ggctcgcgg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	gccctcccgt	2520
20	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	tagacagatc	2580
	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggttaactgt	cagaccaagt	ttactcatat	2640
	atactttaga	ttgattttaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctagg	gaagatcctt	2700
	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	cgttccactg	agcgctcagc	2760
	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgcgt	aatctgctgc	2820
25	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	tggtgtttgt	tgccggatca	agagctacca	2880
	actctttttc	cgaaggtaac	tggttccagc	agagcgcaga	taccaaatat	tgttcttcta	2940
	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	atacctcgct	3000
	ctgctaattcc	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtgggcgata	agtcgtgtct	taccgggttg	3060
	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	gggttcgtgc	3120
30	acacagccca	gcttgaggcg	aacgacctac	accgaactga	gatacctaca	gcgtgagctt	3180
	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcgga	ggatccgggt	aagggcgagg	3240
	gtcggaaacag	gagagcgac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	tctttatagt	3300
	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgctcgattt	tgtagtgctc	gtcagggggg	3360
	cgagagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcttctttac	ggttccctgg	cttttgctgg	3420
35	ccttttgctc	acatgtttct	tcctgcgtta	tcctctgatt	ctgtggataa	ccgtattacc	3480
	gcctttgagt	gagctgatac	cgctgcgcgc	agccgaacga	ccgagcgag	cgagtcagtg	3540
	agcgaggaag	cggaagagcg	cccaatacgc	aaaccgcctc	tcccgcgcgc	ttggccgatt	3600
	cattaatgca	gctggcacga	caggtttccc	gactggaaag	cgggcagtg	gcgcaacgca	3660
40	attaatgtga	gttagctcac	tcattaggca	ccccaggctt	tacactttat	gcttccgggt	3720
	cgtagtgtgt	gtggaattgt	gagcgggata	caatttcaca	caggaaacag	ctatgacctg	3780
	gattacgaat	gtccatgcct	cgaggatcta	acatgcttag	atacatgaag	taacatgctg	3840
	ctacgggtta	ataattcttg	agttgatttt	tactggtagt	tagatagatg	tatatatag	3900
	cttagataca	tgaagtaaca	tgctcctaca	gttcccttaa	tcattattga	gtacctatat	3960
45	attctaataa	atcagtatgt	tttaaatatt	tttgatttta	ctggtagtta	gatagatgta	4020
	tatatatcatg	ctcaaacatg	cttagataca	tgaagtaaca	tgctgctacg	gtttagtcac	4080
	tattgagtgc	ctataatttc	taataaatca	gtatgtttta	aattattttg	atTTtactgg	4140
	tacttagata	gatgtatata	tacatgctca	aacatgctta	gatacatgaa	gtaatatgct	4200
	actacgggtt	aattgttctt	gagtagctat	atatttcta	aaatcagtat	gttttaatt	4260
50	atTTcgattt	tactggtagt	tagatagatg	tatatataca	tgcttagata	catgaagtaa	4320
	catgctacta	cggttttaatt	gttcttgaat	acctatatat	tctaataaat	cagtagtttt	4380
	taaattattt	cgatttttact	ggtagcttag	tagatgtata	tatacatgct	cgaacatgct	4440
	tagatacatg	aagtaacatg	ctacatatat	attataataa	atcagtatgt	cttaaatatt	4500
	tttgatttta	ctggtagctta	gatagatgta	tatacatgct	caaacatgct	tagatacatg	4560
55	aagtaacatg	ctactacggt	ttaatcatta	ttgagtacct	atataattcta	ataaaatcag	4620
	atgtttttcaa	ttgttttgat	tttactggta	cttagatata	tgtagatata	catgctcgaa	4680
	catgcttaga	tacgtgaagt	aacatgctac	tatggttaat	tgttcttgag	tacctatata	4740
	ttctaataaaa	tcagtatgtt	ttaaattatt	tcgattttac	tggtacttag	atagatgtat	4800
	atatacatgc	tcgaacatgc	ttagatacat	gaagtaacat	gctactacgg	tttaatcggt	4860
	cttgagtacc	tatatattct	aataaatcag	tatgtcttaa	attatcttga	ttttactgg	4920
60	acttagatag	atgtatatata	atgcttagat	acatgaagta	acatgctact	atgattttaa	4980
	cggtcttgag	tacatatata	ttctaataaa	tcagtagttt	tttaattatt	ttgattttac	5040
	tggtacttag	atagatgtat	atatacatgc	tcgaacatgc	ttagatacat	gaagtaacat	5100
	gctactacgg	tttaatcatt	cttgagtacc	tatatattct	aataaatcag	tatgttttta	5160
	attatttttga	tattactgggt	acttaacatg	tttagataca	tcatatagca	tgacatgct	5220
65	gctactggtt	aatcattcgt	gaatacctat	atatttcta	atatcagtat	gtcttcta	5280
	tattatgatt	ttgatgtact	tgtaggtggt	catatgctgc	agctatgtgt	agattttgaa	5340

29

taccacagtgt gatgagcatg catggcgcct tcatagttca tatgctgttt atttcctttg 5400
agactgttct tttttgttga tagtcaccct gttgtttggt gattcttatg cacc 5455

- 5 <210> 34
<211> 12633
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

- 10 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant
expression vector pLo114UbiBI-1

<400> 34
15 aattcactgg cgcgcgtttt acaacgactc agagcttgac aggaggcccg atctagtaac 60
atagatgaca cgcgcgcgga taatttatcc tagtttgccg gctatatattt gttttctatc 120
gcgtattaaa tgtataattg cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc 180
atgcattaca tgttaattat tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc 240
atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga 300
20 tcggggatca tccgggtctg tggcgggaac tccacgaaaa tatccgaacg cagcaagatc 360
tagagcttgg gtcccgtca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc 420
gaatcgggag cggcgatacc gtaaagcacg aggaagcggg cagccattc gccgccaagc 480
tcttcagcaa tatcacgggt agccaacgct atgtcctgat agcggctccg cacaccagc 540
cggccacagt cgatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag 600
gcacgcccac gggtcacgac gagatcctcg ccgtcgggca tgcgcgcctt gagcctggcg 660
aacagttcgg ctggcgcgag cccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga 720
cgggcttcca tccgagtacg tgctcgtcgc atgcgatgtt tcgcttggtg gtcgaatggg 780
caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc tgcagttcat cagccatgat ggatactttc 840
tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tccctgcccc gcacttcgcc caatagcagc 900
cagtcocctc ccgcttcagt gacaacgtcg agcacagctg cgcaaggaa ccccgctcgtg 960
30 gccagccacg atagccgcgc gcgcccctgc gctgacagcc ggaacacggc ggcacagag 1020
gtcttgacaa aaagaaccgg gcgcccctgc cccaatagcc tctccaccga agcggccgga 1080
cagccgattg tctgttgtgc ccagtcatag atgcgaaacg atccagatcc ggtgcagatt 1140
gaacctgcgt gcaatccatc tgagactcta attggatacc gaggggaatt tatggaacgt 1200
35 atttgattg agagtgaata tgagactcta attggatacc gaggggaatt tatggaacgt 1260
cagtgagaca tttttgacaa gaaatatatt cttagctgata gtgaccttag gcgacttttg 1320
aacgcgcaat aatgggtttct gacgtatgtg tcagttccaa acgtaaaacg gcttgtcccg 1380
ctgagtggtc ccttcaacgt tgccgttctg cttaattctc cgctcatgat cagattgtcg 1440
40 cgtcatcgcc gggggtcata acgtgactcc cttaattctc cgctcatgat cagattgtcg 1500
tttcccgcct tcagtttaaa ctatcagtgt ttgacaggat cctgcttggt aataattgct 1560
attagattgt ttttatgcat agatgcactc gaaatcagcc aatttttagc aagtatcaaa 1620
cggatgttaa ttcagtacat taaagacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc 1680
aatttgttta caccacaata tatcctgcc aacagctccc aacagctccc cgaccggcag 1740
ctcggcacia aatcaccacg cgttaccacc ccagccagcc ggcgcatggt gttgaccgtg 1800
45 ttcgcccggc ttgcccaggt cgagcgttcc ctaatcatcg accgcacccg gagcgggccc 1860
gaggccgcca aggcccgagg cgtgaagttt ggcccccgcc ctaccctcac ccgggcacag 1920
atcgcgcacg cccgcgagct gatcgaccag gaaggccgca ccgtgaaaga ggcggctgca 1980
ctgcttggtg tgcatcgctc gacctgttac cgcgcacttg agcgcagcga ggaagtgcg 2040
cccaccgagg ccaggcggtg cgggtgcctc cgtgaggacg cattgaccga ggcgacgcc 2100
50 ctggcggtcg ccgagaatga acgccaagag gaacaagcat gaaacccgac caggacggcc 2160
aggacgaacc gtttttcatt accgaagaga tgcaggcgga gatgatcgcg gccgggtacg 2220
tgttcagacc gcccgcgac gtctcaaccg tgcggctgca tgaatcctg gccgggttgt 2280
ctgatgccaa gctggcggtc tggccggcca gcttggccgc tcatgctggtc gctgcgtata 2340
55 gtctaaaaag gtgatgtgta tttgagtaaa acagcttgcg atgaagggtt tcgctgtact 2400
tgatgcgatg agtaataaaa caaatacgca aggggaacgc atctagccc gcgccctgca 2460
taaccagaaa ggccgggtcag gcaagacgac catcgcaacc cagggcagtg ccgcccagtg 2520
actgcgctgg gccgatgttc tgttagtcga ttccgatccc cagggcagtg ccgcccagtg 2580
ggcgcccggt cgggaagatc aaccgctaac cgttgcggcg atcgaccgcc cgaccattga 2640
60 ggccgacgtg aaggccatcg gccggcgcca ctctgtagt atcgaccgcc cgccccaggg 2700
agccgacttg gctgtgtccg cgatcaaggc agccgacttc gtgctgattc cgtgacgcc 2760
aagcccttac gacatatggg ccaccgccga cctgggtggag ctggttaagc agcgattga 2820
ggtcacggat ggaaggctac aagcggcctt tgcgtgtcgc cggggatca aaggcacgcg 2880
catcgcggtg gaggttgccg aggcgctggc cgggtacgag tgcggccgcc ttgagtcgg 2940
tatcacgcag cgcgtgagct acccagccac cccgcgaggt ccaggcgctg gccgctgaaa ttaaatcaaa 3000
65 agaaccggag ggcgacgctg cccgcgaggt ccaggcgctg gccgctgaaa ttaaatcaaa 3060
actcatttga gttaatgagg taaagagaaa atgagcaaaa gcacaaacac gctaagtgc 3120

30

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ggcgcgtccga ggcgcacgcag cagcaaggct gcaacgttgg ccagcctggc agacacgccca 3180
gccatgaagc ggggtcaactt tcagttgccc gcgaggagtc acaccaagct gaagatgtac 3240
gcggtacgcc aaggcaagac cattaccgag ctgctatctg aatacatcgc gcagctacca 3300
gagtaaatga gcaaatgaat aaatgagtag atgaatttta gcggctaaag gaggcgcat 3360
ggaaaatcaa gaacaaccag gcaccgacgc cgtggaatgc cccatgtgtg gaggaacggg 3420
cgggttggcca ggcgtaagcg gctgggttgt ctgccggccc tgcaatggca ctggaacccc 3480
caagcccagag gaatcggcgt gagcggctcg aaaccatccg gcccgtaca aatcggcgcg 3540
gcgctgggtg atgacctggt ggagaagtgg aaggccgcgc aggccgccca gcggcaacgc 3600
atcgaggcag aagcacgccc cgggtgaatcg tggcaagcgg ccgctgatcg aatccgcaaa 3660
gaatcccggc aāccgcccggc agccgggtgcg ccgtcgatta ggaagccgcg caagggcgag 3720
gagcaaccag attttttcgt tccgatgctc tatgacgtgg gcaccccgca tagtcgcagc 3780
atcatggacg tggccgtttt ccgtctgtcg aagcgtgacc gacgagctgg cgaggtgatc 3840
cgctacgagc ttccagacgg gcacgtagag gtttcccgag ggccggccgg catggccagt 3900
gtgtgggatt acgacctggt actgatggcg gtttcccatc taaccgaatc catgaaccca 3960
taccgggaag ggaagggaag caagcccggc cgcgtgttcc gtccacacgt tgcggacgta 4020
ctcaagttct gccggcgagc cgatggcgga aagcagaag acgacctggt agaaacctgc 4080
attcggttaa acaccacgca cgttgccatg cagcgtacga agaaggccaa gaacggccgc 4140
ctggtgacgg tatccgaggg tgaagccttg attagccgct acaagatcgt aaagagcgaa 4200
accgggcccgc cggagtacat cgagatcgag ctatgctgatt ggatgtaccg cgagatcaca 4260
gaaggcaaga acccggacgt gctgacggtt caccctgatt actttttgat cgatcccggc 4320
atcgcccggt ttctctaccg cctggcacgc agcgcccgag gcaaggcaga agccagatgg 4380
ttgttcaaga cgatctacga acgcagtggc agcgccggag agttcaagaa gttctgttcc 4440
accgtgcgca agctgatcgg gtcaaatgac ctgccggagt acgatttgaa ggaggaggcg 4500
gggcaggctg gccgatccct agtcacgcgc taccgcaacc tgatcgaggg cgaagcatcc 4560
gccggttccct aatgtacgga gcagatgcta gggcaaattg ccctagcagg ggaagaaagg 4620
cgaaaagggtc tctttcctgt ggatagcacg tacattggga acccaaagcc gtacattggg 4680
aaccggaacc cgtacattgg gaaccacaag ccgtagacattg ggaaccggtc aaaactcttt 4740
gtgactgata taaaagagaa aaaatgcgag ttttccgctc taactgtctg gccagcgcac 4800
aaaactctta aaaccgcctt cggctgtgca taactgtctg gcccgcctac agccgaagag 4860
ctgcaaaaag cgcctaccct tcggtcgtcg cgtccctac gctggcctac tccgctcg 4920
cctatcgccg ccgctggccg ctcaaaaatt gctggcctac cgcggcgcc cccctgcct 5040
cgcggaacaag ccgcccgcgc ggcactcgac ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac 5100
cgcgctgttc ggtgatgacg cccggagcag acaagcccgt caggggcgct cagcggtgt 5160
agcttgtctg taagcggatg ccctgaccca gtcacgtagc gatagcggag tgtatactgg 5220
tggcgggtgt cggggcgag ccagattgta ctgagagtg accatattgc gtgtgaaata 5280
cttaactatg cggcatcaga aaaataccgc cttaggcgt cttccgcttc ctogctcact 5340
ccgcacagat gcgtaaggag tcggctgcgg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggt 5400
gactcgctgc gctcggtcgt aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag 5460
atacggttat ccacagaatc aaaggcccgc agtcagaggt agtcagaggt gctccgccc 5520
caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggcccgc agtcagaggt agtcagaggt gctccgccc 5580
cctgacgagc atcacaaaaa tccagcgtca tccctgagtc gctctcctgt gacaggacta 5640
taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc ccttcgggaa ccttcgggaa gcttccatagc 5700
ccgcttaccg gatacctgtc ttcggtgtag ttcggtgtag tttccggtg cgtgtgtgac 5760
taacgtgtga ggtatctcag ttcggtgtag tttccggtg actatcgctc tgagtccaac 5820
45 gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgac gtagccactg gtaacaggat tagcagagcg 5880
ccggttaagac acgacttatc gccactggca ctaactacgg ctacactaga 5940
aggatgttag gcggtgtac agagtctctg aagtgggtgg ccttcggaaa aagagttggt 6000
aggacagtat ttggtatctg cgctctgtcg aagccagttt gtttttttgt ttgcaagcag 6060
agctcttgat ccggcaaaaca aaccaccgct ggttagcggg tgatcttttc tacgggggtc 6120
cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gggatttttg tcatgcatga tatatctccc 6180
gacgtcagtg ggaacgaaaa ctacagttaa gggatttttg aagcagactt gacctgatag 6240
aatttgtgta gggcttatta tgcacgttta aaaataataa tgagttaagc cgcccgcgca 6300
tttggctgtg agcaattatg tgcttagtgc atctaaccgt tggcgtactc cttgggtgatc 6360
agcggcgctg gcttgaacga atttctagct agacattatt cgccgagggc caagcgatct 6420
55 tcgcttttca cgtagtggac aaattcttcc aactgatctg tcaagtatga cgggctgata 6480
tcttctgtgc caagataagc ctgtctagct tccctcggcg cgattttgct ggttactcg 6540
aggcgctcca ttgcccagtc cgtgaagcact acatttcgct atagatcctg ttcaggaacc 6600
ctgtaccaaa tgccgggacaa ggttttcatt agcgctcaa cgctatgttc tcttgctttt 6660
60 ggatcaaaga gttcctccgc cgttgacact accaaggcaa cgtatgttcc tgcaagatg 6720
gtcagcaaga tagccagatc aatgtcgatc gtggctggct cggcgcttag ctggataacg 6780
tcattgcgct gccattctcc aaattgcagt tccgcttag gaactctcgt ctctccagg 6840
atgtcgctcg gcacaacaat ggtgacttct acagcgcgga cgtgtgttcc atcaagcctt 6900
gaagccgaag tttccaaaag gtcgttgatc aaagctcgcc gcgtgtgttc atccactgcg 6960
65 acgggtcaccg taaccagcaa atcaatatca ctgtgtggct tcaggccggc gacgccaact 7020
gagccgtaca aatgtacggc cagcaacgtc ggttcgagat ggcgctcgat 7080

31

5 acctctgata gttgagtcga tacttcggcg atcacccgctt ccccatgat gtttaacttt 7140
gttttagggc gactgccctg ctgcgtaaca tcggtgctgc tccataacat caaacatcga 7200
cccacggcgt aacgcgcttg ctgcttgat gcccgaggca tagactgtac ccaaaaaaaa 7260
cagtcataac aagccatgaa aaccgccact gcgggggttc catggacata caaatggacg 7320
aacggataaa ccttttcacg cccttttaaa tatccgatta ttctaataaa cgctcttttc 7380
tcttaggttt acccgccaat atatcctgtc aaacactgat agtttaaaact gaaggcggga 7440
aacgacaatc agatctagta ggaaacagct atgaccatga ttacgccaag cttgcatgcc 7500
tgcaggtcga ctctagagga tcgatccccg ggtaggtcag tcccttatgt tacgtcctgt 7560
agaaacccca acccggtgaaa tcaaaaaact cgacggcctg tgggcattca gtctggatcg 7620
10 cgaaaactgt ggaattgggtc agcggttggtg ggaaagcgcg ttacaagaaa gccgggcaat 7680
tgctgtgcca ggcagtttta acgatcagtt cgcgatgca gatattcgta attatgcggg 7740
caacgtctgg tatcagcgcg aagtctttat accgaaaggt tgggcaggcc agcgtatcgt 7800
gctgcgtttc gatgcggtca ctocattacgg caaagtgtgg gtcaataatc aggaagtgat 7860
ggagcatcag ggcggctata cgccatttga agccgatgtc acgccgtatg ttattgcggg 7920
15 gaaaagtgta cgtaagtttc tgcttctacc tttgatata atataataat tatcatat 7980
tagtagtaat ataataatttc aaataattttt ttcaaaataa aagaatgtag tatatagcaa 8040
ttgctttttc gtagtttata agtgtgtata gtatcacctg ttgtgtgaac aacgaactga actggcagac 8100
caaaatttgt tgatgtgcag ttaccgacga aaacggcaag aaaaagcagt cttacttcca 8160
tatcccgccg ggaatggtga taatccatcg cagcgtaatg ctctacacca cgccgaacac 8220
20 tgatttcttt aactatgccg gaatccatcg tgcgcgcaa gactgtaacc accgctctgt 8280
ctgggtggac gatatcaccg tggtgacgca cagcggtgaa ctgctgtatg cggatcaaca 8340
tgactggcag gtggtggcca atggtgatgt gactttgcaa gtggtgaatc cgcacctctg 8400
gggtggtgca actggacaag gcactagcgg gtcggtcaca gtgaagggcg aacagttcct 8460
25 gcaaccgggt gaaggttatc tcggcatccg gtcagtggca gtgaagggcg aacagttcct 8520
tgatatctac ccgcttcgcg actttactgg ctttggctcg catgaagatg cggacttgcg 8580
gattaaccac aaaccggtct tgctgatggt ttacgctgaa gagatgctcg actgggagc 8640
tggcaaggga ttcgataacg tgctgatggt cgcatttacc tgctgtctgc ggctttaacc tctcttttag 8700
ggccaactcc taccgtacct ttgatgaaac agaactgtac agcgaagagg actggtatgg 8760
30 tgaacatggc atcgtggtga acaagccgaa atagcgctg atagcgctg acaaaaaacca 8820
cattggtttc gaagcgggca tacaggcgat cgaaccggat acccgctccg aaggtgcacg 8880
ggaaactcag caagcgact taccgacac gcgtaaaact gaccgcagc gtccgatcac 8940
cccaagcgtg gtgatgtgga gtattgccaa caccgatacc atcagcgatc tctttgatgt 9000
ggaatatttc ggcgcaactg cggaagcaac caccgatacc atcagcgatc tctttgatgt 9060
35 ctgctgcaat gcaatggtt aacggttatt acggatggta tgtccaaagc ggcgatttgg aaacggcaga 9120
gctgtgctg gaaaaaagac ttctggcctg gcaggagaaa ctgcactca atgtacaccg acatgtggag 9180
gaaggtactg ggcgtggata ggctggatat gtatcacccg gtctttgatc gcgtcagcgc 9240
caccgaatac cagtggtgat ggaatttcgc cgattttgag acctcgcaag gcatattgag 9300
tgaagagtat cagtggtgat ggaatttcgc cgattttgag acctcgcaag gcatattgag 9360
40 cgttggcggg aacaagaaag ggatcttcac ctgcgacgc aaaccgaagt cggcggtctt 9420
ctgctgcaa aaacgctgga cctcggtgaa aaaccgcagc agggaggcaa 9480
acaatgagag ctgcaatttc cccgatcggt caaacatttg gcaataaagn ttcttaagat 9540
tgaatcctgt tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc 9600
45 atgtaataat taacatgtaa tgcatgagta ttttatgag atgggttttt atgattagag 9660
tcccgcgaatt atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atancgcgca aactaggata 9720
aattatcgcg cgcggtgtca tctatgttac tagatcggga attcccatgc ctcgaggatc 9780
taacatgctt agatacatga agtaacatgc tgctacggtt taataattct tgagttagt 9840
tttatggta ctttagataga tgatataca tgcttagata catgaagtaa catgctccta 9900
50 cagttccttt aatcattatt gagtacctat atattctaatt aaatcagtat gttttaaat 10020
attttgattt tactggtact tagatagatg tatatataca tgctcaaaata tgcttagata 10080
catgaagtaa catgctgcta cggttttagt attattgagt gcctataatt tctaataaat 10140
cagtatgttt taaattattt tgattttact ggtacttaga tagatgtata tatacatgct 10200
caaacatgct tagatacatg aagtaatatg ctactacggt ttaattgttc ttgagtacct 10260
atataattca ataaatcagt atgtttttaa ttatttcgat tttactggta cttagataga 10320
55 tgtatatata catgcttaga tacatgaagt aacatgctac tacggtttta ttggttctga 10380
atccctatat atttcaataa atcagtatgt tttaaattat ttcgatttta ctggtactta 10440
gatagatgta tatatacatg ctcgaaacatg cttagataga tgaagtaaca tgctacatat 10500
atattataat aaatcagtat gtcttaaat tttttgattt tactggtact tagatagatg 10560
tatatacatg ctcaaacatg cttagataga tgaagtaaca tgctactacg gtttaatcat 10620
60 tattgagtac ctatatattc taataaatca gatgtttttc aattgttttg attttactgg 10680
tacttagata tatgtatata aacatgctta gatacgtgaa gtaacatgct 10740
actatgggta attgttcttg agtacctata tattctaata aatcagtatg ttttaaat 10800
tttcgatttt actggtactt agatagatgt atataacat gctcgaacat gcttagatac 10860
atgaagtaac atgtactac ggtttaatcg tctttgagta cctatatatt ctaataaatc 10920
65 agtatgtctt aaattatctt gattttactg gtacttagat agatgtatat acatgcttag 10980
atacatgaag taacatgcta ctatgattta atcggtcttg agtacctata tattctaata 11040

32

aatcagtatg tttttaatta ttttgatttt actgggtactt agatagatgt atatatacat 11100
gctcgaacat gcttagatac atgaagtaac atgctactac gggttaataca ttcttgagta 11160
cctatatatt ctaataaatac agtatgtttt taattatttt gatattactg gtacttaaca 11220
tgtttagata catcatatag catgcacatg ctgctactgt ttaatcattc gtgaatacct 11280
5 atatatctta atatatcagt atgtcttcta attattatga ttttgatgta cttgtatggt 11340
ggcatatgct gcagctatgt gtagattttg aatacccagt gtgatgagca tgcattggcg 11400
cttcataagt catatgctgt ttatttcctt tgagactgtt cttttttgtt gatagtcacc 11460
ctgtttgttg gtgattctta tgcaccggg gatcctctag agtcgacctg caggcgcccg 11520
cactagtgat taggattcca acgcgagcca ggacaagcga ggaaccttgc gtgcgaggcg 11580
10 aggcgcgccc gctccgattc gattcgacgc gcaggcgagc gcgcagggat ggacgccttc 11640
tactcgacct cgtcggcggc ggcgagcggc tggggccacg actccctcaa gaacttccgc 11700
cagatctccc ccgctgtgca gtccacctc aagctcgttt acctgactct atgctttgca 11760
ctggcctcat ctgcccgtggg tgcttaccta cacattgccc tgaacatcgg cgggatgctg 11820
acaatgctcg cttgtgtcgg aactatgcc ctctggcctg cggatgaggag ctatgaggag 11880
15 aggaagaggt ttgggctgct gatgggtgca gccctcctgg aaggggcttc ggttggacct 11940
ctgattgagc ttgcataga ctttgaccca agcatcctcg tgacagggtt tgcggaacc 12000
gccatcgctt ttgggtgctt ctctggcgcc gccatcatcg ccaagcgagc ggagtacctg 12060
tacctcggtg gcctgctctc gtctggcctg tctgactctg tctggctgca gtttgcacg 12120
tccatctttg gccactcctc tggcagcttc atgtttgagg tttactttgg cctgttgatc 12180
20 ttcttggggg acatggtgta cgacacgcag gagatcatcg agaggcgca ccatggcgac 12240
atggactaca tcaagcacgc cctcacctc ttccaccgact ttgttgcctg cctcgtccga 12300
gtcctcatca tcatgctcaa gaacgcagc gacaagtcgg aggacaagaa gaagaggaag 12360
agggggtcct gaacgtwtct cccgcacatg tagataccgt caccgcgtcg acctgcagcg 12420
atgcccgtcg aaatcaccag tctctctcta caaatctatc tctctcataa taatgtgtga 12480
25 gtagttocca gataaggga ttaggggttct tatagggttt cgctcatgtg ttgagcatat 12540
aagaaccct tagtatgtat ttgtatttgc aaaatacttc tatcaataaa atttctaatt 12600
cctaaaacca aaatccagtg ggtaccgagc tgc 12633

30 <210> 35
<211> 5598
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

35 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant
expression vector pOXoBI-1

<400> 35
40 ggggatcctc tagagtgcac ctgcaggcgg ccgcactagt gattaggatt ccaacgcgag 60
ccaggacaag cgaggaaact tgcgtgcgag gcgaggccgc cccgctccga ttcgattcga 120
cgcgaggcgg caggcgacag gatggacgcc ttctactoga cctcgtccgc ggcggcgagc 180
ggctggggcc acgactccct caagaacttc cgcagatct ccccgcctg gcagtccac 240
45 ctcaagctcg tttacctgac tctatgctt gcactggcct catctgccgt ggggtgcttac 300
ctacacattg ccctgaacat cggcgggatg ctgacaatgc tcgcttgtgt cggaaactatc 360
gcctggatgt tctcggtgcc agtctatgag gagaggaaga gggttgggct gctgatgggt 420
gcagccctcc tgggaagggg ttcggttga cctctgattg agcttgccat agactttgac 480
ccaagcatcc tctgacagc gtttgtcgga accgccatcg cctttgggtg ctctctggc 540
gccgccatca tcgccaaagc cagggagtag ctgtacctcg gtggcctgct ctcgtctggc 600
50 ctgtcgatcc tgctctggct gcagtttgc acgtccatct ttggccactc ctctggcagc 660
ttcatgtttg aggtttactt tggcctgtt atcttctctg ggtacatggt gtacgacacg 720
caggagatca tcgagagggc gcaccatggc gacatggact acatcaagca cgccctcacc 780
ctcttcaccg actttgttgc cgtcctcgtc cgagtcctca tcatcatgct caagaacgca 840
ggcgacaagt cggaggacaa gaagaagagg aagagggggt cctgaacgtw tctcccgac 900
55 atgtagatac cgtcaccgcg tcgacctgca ggcattgccg ctgaaatcac cagtctctct 960
ctacaaatct atctctctca taataatgtg tgagtatttc ccagataagg gaattagggt 1020
tcttataggg tttcgctcat gtgttgagca tataagaaac ccttagtatg tatttgtatt 1080
tgtaaaatac ttctatcaat aaaatttcta attcctaaaa ccaaaatcca gtgggtaccg 1140
agctcgaatt caagcttggc actggccgct gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct 1200
60 ggcgttacc aacttaatcg ccttgacgca catccccctt tgcagagctg gcgtaatagc 1260
gaagaggccc gcaccgatcg ccttcccaa cagttgcgca gctgaatgg cgaatggcg 1320
ctgatgcgg attttctct tacgcatctg tgccgttatt cacaccgcat atgggtgact 1380
ctcagtacaa tctgctctga tgcgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacacc 1440
gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc 1500
65 gtctccggga gctgcatgtg tcagagggtt taccgctcat caccgaaacg cgcgagacga 1560
aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag 1620

	acgtcaggtg	gcacttttcg	gggaaatgtg	cgcgggaacc	ctatttggtt	atttttctaa	1680
	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgct	tcaataatat	1740
	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	cttttttgcg	1800
5	gcattttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccga	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	agatgctgaa	1860
	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	taagatcctt	1920
	gagagttttc	gccccgaaga	acgttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	tctgctatgt	1980
	ggcgcggtat	tatcccgat	tgacgcccgg	caagagcaac	tcggtcgccc	catacactat	2040
	tctcagaatg	acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	ggatggcatg	2100
10	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataacactgc	ggccaactta	2160
	cttctgacaa	cgatcgaggg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	catgggggat	2220
	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	aaacgacgag	2280
	cgtgacacca	cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgcttc	gcaaaactat	aactggcgaa	2340
	ctacttactc	tagcttcccg	gcaacaatta	atagactgga	tgaggcgga	taaagttgca	2400
	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	atctggagcc	2460
15	ggtagagcgt	gggtctcggg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	gccctcccgt	2520
	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	tagacagatc	2580
	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggttaactgt	cagaccaagt	ttactcatat	2640
	atactttaga	tgattttaa	acttcaattt	taatttaaaa	ggatctaggt	gaagatcctt	2700
	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	cgttccactg	agcgtcagac	2760
20	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcccgt	aatctgctgc	2820
	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	ttggtttggg	tgccggatca	agagctacca	2880
	actctttttc	cgaaggtaac	tggtctcagc	agagcgcaga	taccaaatac	tgctcttcta	2940
	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	atacctcgct	3000
	ctgctaattc	tggtaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	taccgggttg	3060
25	gactcaagac	gtaggttacc	ggataaggcg	cagcggctcg	gctgaacggg	gggttcgtgc	3120
	acacagccca	gcttggagcg	aacgacctac	accgaactga	gatacctaca	gcgtgagctt	3180
	tgagaaagcg	ccagcgttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggatatccgt	aagcggcagg	3240
	gctcgaaacg	gagagcgcac	gagggagcgt	ccagggggaa	acgcctggta	tctttatagt	3300
	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgctcgattt	tgtagtgctc	gtcagggggg	3360
30	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	cttttgctgg	3420
	ccttttgctc	acatgttctt	tcctgcgtta	tcccctgatt	ctgtggataa	ccgtattacc	3480
	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	agccgaacga	ccgagcgag	cgagtcaagt	3540
	agcgaggaag	cggaagagcg	cccaatacgc	aaaccgcctc	tccccgcgcg	ttggccgatt	3600
35	cattaatgca	gctggcacga	caggtttccc	gactggaaag	cgggcagtg	gcgcaacgca	3660
	attaatgtga	gttagctcac	tcattaggca	ccccaggctt	tacactttat	gcttccggct	3720
	cgtagtttgt	gtggaattgt	gagcggataa	caatttcaca	caggaaacag	ctatgaccat	3780
	gattacgaat	tcccatgcct	cgagcagaaa	gatataatat	gtaaaaaaat	gggtctatat	3840
	atatggaag	tttcaggaag	acaaagggtc	tagaaaactc	caaaaaaaat	ccagaatata	3900
	ttttggaaga	aataccctct	tggttgggcc	ccggcgagcg	ccctagtggg	ccaaaaagcc	3960
40	acgatcta	cccggtctaa	ttgggtcta	agtttagact	tctaattaga	cggtctctta	4020
	tcctgtctct	ctagttttct	cggagctctt	tttcatggac	aatatgaacg	caactaggct	4080
	ctacttcgga	actcgtggat	acttcagagt	gcacatctac	cttgaagtat	tgccggatca	4140
	tcactctcga	gaaattctca	cagttgggag	gtataaccag	ttgcccgaat	gattggtaga	4200
45	cactcacagc	caggatcagc	ccatgtccca	aggcaaccct	tgtagctaca	tgccgagggc	4260
	tgactacttg	gggcctcgcg	ccctgcattt	ttgcatgttc	atgtgacacg	ttaaatgttg	4320
	agagaaatag	attactaaat	atcaccattt	tcgttattct	agatgagtat	ctacaatat	4380
	gtataccgaa	aaatgtat	taaaactgtg	taggtgagaa	agatctatta	aaaagaactc	4440
	tacgtatact	ccccctccc	aatccccatc	caggtttgta	agacactttc	gtcttttttt	4500
50	gccgaatttt	aaccgtaaat	ttgactagta	aaaataagtt	atactgaatg	taataaatat	4560
	cgtacattog	gatgttggag	acagggagag	gctggctggg	gcgctggatg	gatcacggtc	4620
	agaaagtctg	acttgcacg	ccacaggccc	gttgattggc	actgacaacc	aagttttcgt	4680
	tgtttcgctg	gtgccatatt	ttccgcgatc	gaatatttaa	actgagagga	aagttttcgt	4740
	cagggcgcca	tatcagcact	tgatcactca	ctgatcgatc	agtagtagcc	accttctctg	4800
55	cgccgacgtg	ttatatatta	ttggcaacaa	gtcatcgatt	gagaacagaa	acaaaacaag	4860
	aagagaacta	tttgagagag	agtagttacg	ccgcagcgag	tagcctccca	tttctgacga	4920
	tcattgcca	cgataaacg	gcccggcgcg	agaccagtta	gcaaggttga	aatgccaaca	4980
	catgtcgcgc	tcatttctcg	gctttttcat	tttgcattgc	gtcatgcagg	ccctggacac	5040
	tgacatttct	ctcttttgct	gttgaaatga	gaccctaacc	tttcaccatc	agcacgccc	5100
60	tcaacttgat	aagcctagac	gaaaccata	tgcatgattg	atgagtaatg	gtgtgcacga	5160
	atattatgaa	cccgtttcca	agagcaatac	tcatttgaga	tacacctcct	ccttgatctc	5220
	gttcgttggg	cccatttcca	tagcagccgg	cagtggcctt	gactctgact	gccacgcaag	5280
	taataatact	tttaataaact	cgctgccttg	cttcgtgtgt	ccatttgcaa	atgcatgcag	5340
	tgacgacatg	cacatgcata	gcttaattag	ctccatgcac	cacttgcttc	cattaatccc	5400
65	ctatataaag	gactccatat	gcctcaccat	tcactcatcc	accacagctt	agcagcagca	5460
	acaaccagtg	ccatagacac	tctccatcaa	caaactctag	ctgatcaatc	ctagctaage	5520

ttattacata gcaagccc

5598

- 5 <210> 36
<211> 12776
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

- 10 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant
expression vector pLol140XoBI-1

<400> 36
aattcactgg cgcgcgtttt acaacgactc agagcttgac aggaggcccg atctagtaac 60
15 atagatgaca ccgcgcgcga taatttatcc tagtttgccg gctatatattt gttttctatc 120
gcgtattaaa tgtataattg cgggactcta atcataaaaa ccatctcat aaataacgctc 180
atgcattaca tgtaattat tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc 240
atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga 300
tcggggatca tccgggtctg tggcgggaac tccacgaaaa tatccgaacg cagcaagatc 360
20 tagagcttgg gtcccgcctc gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc 420
gaatcgggag cggcgatacc gtaagcacg aggaagcggg cagcccatc gccgccaagc 480
tcttcagcaa tatcacgggt agccaacgct atgtcctgat agcgggtccgc cacacccagc 540
cggccacagt cgtatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag 600
gcctcgccat ggtcacgac gagatcctcg ccgtcgggca tgcgcgcctt gagcctggcg 660
25 aacagtccgg ctggcgcgag cccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga 720
ccggcttcca tccgagtacg tgctcgctcg atgcgatgtt tcgcttggtg gtcgaatggg 780
caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc cgcattgcat cagccatgat ggatactttc 840
tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tccctgcccc gcacttcgcc caatagcagc 900
cagtccttcc ccgcttcagt gacaacgctg agcacagctg cgcaaggaaac gcccgctcgtg 960
30 gccagccacg atagccgcgc tgcctcgtcc tgcagttcat tcagggcacc ggacaggctg 1020
gtcttgacaa aaagaaccgg gcgcccctgc gctgacagcc ggaacacggc ggcatcagag 1080
cagccgattg tctgtttgtg ccagtcctag ccgaatagcc tctccacca agcggccgga 1140
gaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc atgcgaaacg atccagatcc ggtgcagatt 1200
35 atttgattg agagtgaata tgagactcta attggatacc gaggggaatt tatggaacgt 1260
cagtgaggca tttttgacaa gaaatatattg ctgctgata gtgaccttag gcgacttttg 1320
aacgcgcaat aatggtttct gacgtatgtg cttagctcat taaactccag aaaccccgcg 1380
ctgagtggct ccttcaacgt tgccggtctg tcagttccaa acgtaaaacg gcttgctccc 1440
cgctacggcg gggggtcata acgtgactcc cttaattctc cgctcatgat cagattgtcg 1500
40 tttccgcct tcagtttaaa ctatcagtggt ttgacaggat cctgcttggt aataattgtc 1560
attagattgt ttttatgcac agatgcactc gaaatcagcc aatttttagac aagtatcaaa 1620
cggatgttaa ttcagtacat taaagacgct cgaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc 1680
aatttgttta caccacaata tatcctgcca ccagccagcc aacagctccc cgaccggcag 1740
ctcggcacaa aatcaccacg cgttaccacc acgcccggcg gccgcatggt gtgaccctg 1800
45 ttcgcccggc ttgcccagtt cgagcgttcc ctaatcatcg accgcacccg gagcggggcg 1860
gaggccgcca agggccgagg cgtgaagttt ggcccccgcc ctaccctcac cccggcacag 1920
atcgcgcacg cccgcgagct gatcgaccag gaaggccgca ccgtgaaaga ggcggctgca 1980
ctgcttgggc tgcacgctc gacctgtac cgcgcaactg agcgcagcga ggaagtgcg 2040
ccacccgagg ccaggcggcg cgggtgcctt cgtgaggacg cattgaccga ggccgacgcc 2100
ctggcggccc ccgagaatga acgccaagag gaacaagcat gaaaccgcac caggacggcc 2160
50 aggacgaacc gtttttcatt accgaagaga tcgaggcggg gatgatcgcg gccgggtacg 2220
tgttcgagcc gcccgcgcac gtctcaaccg tgcggctgca tgaatcctg gccggtttgt 2280
ctgatgccaa gctggcgccc tggccggcca gcttggccgc tgaagaaacc gagcgccgcc 2340
gtctaaaaag gtgatgtgta tttgagtaaa acagcttgcg tcatgcggtc gctgcgtata 2400
tgatgcgatg agtaataaaa caaatacgcg aggggaacgc atgaaggtta tcgctgtact 2460
55 taaccagaaa ggcgggtcag gcaagacgac catcgcaacc catctagccc gcgcctgca 2520
actcgccggg gccgatgttc ttttagtcga ttccgatccc cagggcagtg cccgcgattg 2580
ggcggccggt cgggaagatc aaccgctaac cgttgctggc atcgaccgcc cgacgattga 2640
cccgacgctg aaggccatcg gccggcgcca cttcgtagt atcgacggag cgccccaggc 2700
ggcggacttg gctgtgtccg cgtcaaggc agccgacttc gtgctgattc cgggtcgacc 2760
60 aagcccttac gacatatggg ccaccgccga cctggtggag ctggttaagc agcgcattga 2820
ggtcacggat ggaaggctac aagcggcctt tgcgtgtcg cgggcgatca aaggcacgcg 2880
catcgccggt gaggttgccg aggcgctggc cgggtacgag ctgcccattc ttgagtcgcg 2940
tatcacgcag cgcgtgagct acccaggcac tgcgccgcc gccacaaccg ttcttgaatc 3000
agaaccgag ggcgacgctg cccgcgaggt ccaggcgctg gccgctgaaa ttaaatcaaa 3060
65 actcatttga gttaatgagg taaagagaaa atgagcaaaa gcacaaacac gctaagtgcg 3120
ggccgtccga gcgcacgcag cagcaaggct gcaacgttgg ccagcctggc agacacgcca 3180

35

gccaatgaagc ggggtcaactt tcagttgccc ggcggaggatc acaccaagct gaagatgtac 3240
gcggtacgcc aaggcaagac cattaccgag ctgctatctg aatacatcgc gcagctacca 3300
gagtaaatga gcaaatgaat aaatgagtag atgaatttta gcggctaag gagcgccat 3360
ggaaaatcaa gaacaaccag gcaccgacgc cgtggaatgc cccatgtgtg gaggaacggg 3420
5 cgggttgcca ggcgtaagcg gctgggtgtg ctgcccggccc tgcaatggca ctggaacccc 3480
caagcccagag gaatcggcgt gagcgggtcg aaaccatccg gcccggtaaa aatcggcgcg 3540
gcgctgggtg atgacctggt ggagaagtgg aaggccgcgc aggcgcccca gcggcaacgc 3600
atcgaggcag aagcacgccc cgggtgaatcg tggcaagcgg ccgctgatcg aatccgcaaa 3660
10 gaatcccggc aaccgcccgc agcgggtcg cgttcgatta ggaagccgcc caaggcgagc 3720
gagcaaccag attttttctg tccgatgtc tatgacgtgg gcaccgcga tagtcgcagc 3780
atcatggagc tggcggtttt ccgctctgctg aagcgtgacc gacgagctgg cgaggtgatc 3840
cgctacagc ttccagacgc gcacgtagag gtttccgcag ggccggcccg catggccagt 3900
gtgtgggatt acgacctggt actgatggcg gtttcccatc taaccgaatc catgaaccga 3960
taccgggaag ggaagggaga caagcccggc cgcgtgttcc gtccacacgt tgcggagcta 4020
15 ctcaagttct gccggcgagc cgatggcgga aagcagaaag acgacctggt agaaacctgc 4080
attcggttaa acaccacgca cgttgccatg cagcgtacga agaaggccaa gaacggccgc 4140
ctggtgacgg tatccgaggg tgaagccttg attagccgct acaagatcgt aaagagcgaa 4200
accgggcccgc cggagtacat cgagatcgag ctgactgatt ggatgtaccg cgagatcaca 4260
20 gaaggcaaga acccgagcgt gctgacgggt caccgccgatt actttttgat cgtccccggc 4320
atcgccggtt ttctctaccg cctggcacgc cgcgcgcgag gcaaggcaga agccagatgg 4380
ttgttcaaga cgatctacga acgcagtgcc agcgcgggag agttcaagaa gttctgtttc 4440
accgtgcgca agctgatcgg gtcaaatgac ctgcccggagt acgatttgaa ggaggaggcg 4500
gggcaggctg gcccgatcct agtcatgcgc taccgcaacc tgatcgaggg cgaagcatcc 4560
25 gccggttctt aatgtacgga gcagatgcta gggcaaatgg ccctagcagg ggaaaaaggt 4620
cgaaaagggtc tctttctctg ggatagcagc tacattggga acccaaagcc gtacattggg 4680
aaccggaacc cgtacattgg gaacccaaag ccgtacattg ggaaccgggtc aacacatgtaa 4740
gtgactgata taaaagagaa aaaaggcgat ttttccgcct aaaactcttt aaaacttatt 4800
aaaactctta aaacccgcct ggctctgtca taactgtctg gccagcgcac agccgaagag 4860
ctgcaaaaag ccgctaccct tcggctcgctg cgtccctac gccccgcgcg ttccgctcgg 4920
30 cctatcgccg ccgctggccg ctcaaaaatg gctggcctac ggccaggcaa tctaccaggg 4980
cgccggacaag ccgcgcgcgt gccactcgac cgcggcgccc cacatcaagg caccctgcct 5040
cgccgctttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacgggtcac 5100
agcttctctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcggt cagcggggtg 5160
35 tggcgggtgt cggggcgag ccatgaccca gtcacgtagc gatagcggag gataactctg 5220
cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatattgcg gtgtgaaata 5280
ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcagggcgt cttccgcttc ctccgctcac 5340
gactcgctgc gctcggtcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcgcta 5400
atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag 5460
caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc 5520
40 cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcaaaacc gagaggacta 5580
taaagatacc aggcggtttc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg 5640
ccgcttaccg gatacctgtc cgctcttctc ccttcgggaa cgtgtggcgt ttctcatagc 5700
tcacgctgta ggtatctcag ttccgtgtag gtcgttccg ccaagctggg ctgtgtgcac 5760
45 gaacccccg ttcagcccg ccgctgcgcc ttatccggt actatcgtct tgagtccac 5820
ccggtaaagc acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 5880
aggatgttag cgggtgtctc agagtctctg aagtgggtgg ctaactacgg ctacactaga 5940
aggacagtat ttggtatctg cgtctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttgg 6000
agctcttgat ccggcaaaac aaccaccgct ggtagcgggt gttttttgt ttgcaagcag 6060
cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatctttc tacgggggtc 6120
50 gacgctcagt ggaacgaaaa ctacagttaa gggattttgg tcatgcatga tatatctccc 6180
aattttgtgta gggcttatta tgcacgctta aaaataataa aagcagactt gacctgatag 6240
tttggctgtg agcaattatg tgcttagtgc atctaacgt tgagttaagc cgcgcgcgca 6300
agcggcgctg gcttgaacga atttctagct agacattatt tgccgactac cttggtgatc 6360
tcgcttttca cgtagtggac aaattcttcc aactgatctg cgcgcgaggg caagcagatc 6420
55 tcttcttctc caagataagc ctgtctagct tcaagtatga cgggctgata ctgggcccgg 6480
aggcgctcca ttgcccagtc ggcagcgaca tccttcggcg cgatttttgc ggttactgcg 6540
ctgtaccaaa tgccgggaca cgtgaagcact acatttcgct catcgccagc ccagtcgggg 6600
ggcagattcc atagcgttaa ggtttcattt agcgcctcaa atagatcctg ttcaggaaac 6660
60 ggatcaaaga gtttctccgc cgttggaact accaaggcaa cgctatgttc tcttgccttt 6720
gtcagcaaga tagccagatc aatgtcgatc gtggctggct cgaagatacc tgcaagaatg 6780
tcattgctgt gccattctcc aaattgcagt tcgcgcttag ctggataacg ccacggaatg 6840
atgtcgtcgt gcacaacaat ggtgacttct acagcgcgga gaatctcgt ctctccaggg 6900
gaagccgaag tttccaaaag gtcgttgatc aaagctcgcc gcgttgtttc atcaagcctt 6960
acggctcacc taaccagcaa atcaatatca ctgtgtggct tcaggccgccc atccactgcg 7020
65 gagccgtaca aatgtacggc cagcaacgtc ggttcgagat ggcgctcgat gacgccaact 7080
acctctgata gttgagtcga tacttcggcg atcaccgctt ccccatgat gtttaacttt 7140

36

gttttagggc gactgcccctg ctgcgtaaca tgcgttgctgc tccataacat caaacatcga 7200
cccacggcgt aacgcgcttg ctgcttggat gcccgaggca tagactgtac cccaaaaaaa 7260
cagtcataac aagccatgaa aaccgccact gcgggggttc catggacata caaatggacg 7320
aacggataaa cctttttcacg ccttttttaa tatccgatta ttctaataaa cgctcttttc 7380
5 tcttaggttt ataccgcaat atatcctgtc aaacactgat agtttaaact gaagcgagg 7440
aacgacaatc agatctagta ggaacacagct atgaccatga ttacgccaaag cttgcatgcc 7500
tgagggtcga ctctagagga tcgatccccg ggtagggtcag tcccttatgt tacgtcctgt 7560
agaaacccca acccgtgaaa tcaaaaaact cgacggcctg tgggcattca gtctggatcg 7620
10 cgaaaactgt ggaattgggtc agcgttgggt ggaagcgcg ttacaagaaa gccgggcaat 7680
tgctgtgcca ggcagtttta acgatcagtt cgccgatgca gatattcgta attatgcggg 7740
caacgtctgg tatcagcgcg aagtccttat accgaaaggt tgggcaggcc agcgtatcgt 7800
gctgcgtttc gatgcggtca ctcatcagc caaagtgtgg gtcaataatc aggaagtgt 7860
ggagcatcag ggcggctata cgccatttga agccgatgtc acgccgtatg ttattgcccg 7920
15 gaaaagtgtc ctgaagtctc tgccttctacc ttgatataat atataataat tatcattaat 7980
tagtagtaat ataataattc aaatattttt ttcaaaataa aagaatgtag tatatagcaa 8040
ttgctttttc gtagtttata agtgtgtata ttttaattta taacttttct aatatatgac 8100
caaaatttgt tgatgtgcag gtatcacctg ttgtgtgaac aacgaactga actggcagac 8160
tatcccgccg ggaattgtga ttaccgacga aaacggcaag aaaaagcagt cttacttcca 8220
20 tgatttcttt aactatgccg gaatccatcg cagcgtaatg ctctacacca cgccgaacac 8280
ctgggtggac gatatacccg ttgtgacgca tgcgcgcaa gactgtaacc acgctctgt 8340
tgactggcag gtgggtggca atgggtgatg cagcgttgaa ctgcgtgatg cggaatcaac 8400
gggtgttgca actggacaag gcactagcgg gactttgcaa gtgggtgaatc cgcacctctg 8460
gcaacgggtg gaaggttatc tctatgaact gtgcgtcaca gccaaaagcc agacagagt 8520
25 tgatatctac ccgcttcgcg tcggcatccg ttcagtggca ctgaaggcg aacagttcct 8580
gattaaccac aaaccgttct actttactgg ctttggctcg catgaagatg cggacttgcg 8640
tggaacaggga ttcgataacg tgctgatgtg gcacgaccac gcattaatgg actggattgg 8700
ggccaactcc taccgtacct cgcattaccc ttacgtgaa gagatgctcg actgggcaga 8760
tgaacatggc atcgtggtga ttgatgaac tgctgctgc ggctttaacc tctctttagg 8820
30 cattggtttc gaagcgggca acaagccgaa agaactgtac agcgaagagg cagtcaacgg 8880
ggaaactcag caagcgcaat tacaggcgat taaagagctg atagcgcgtg acaaaaacca 8940
cccaagcgtg gtgatgtgga gtattgccaa cgaacccgat acccgtccgc aagggtgacg 9000
ggaattttc gcgccactgg cggaagcaac gcgtaaactc gaccgcagcg gtccgatcac 9060
ctgcgtcaat gtaattgtct gcgacgtca caccgatacc atcagcgatc tctttgatgt 9120
35 gctgtgcctg aaccgttatt acggatggta tgtccaaagc ggcgatttgg aaacggcaga 9180
gaaggtactg gaaaaagaac ttctggcctg gcaggagaaa ctgcatcagc cgattatcat 9240
caccgaatac ggcgtggata cgtttagcgg gctgcactca atgtacaccg acatgtggag 9300
tgaagagtat cagtgtgcat ggctggatat gtatcacccg gtctttgatc gctcagcgc 9360
cgctcgtcgt gaacagggtat ggaatttcgc cgatttttgc acctcgcaag gcattattgcg 9420
40 cgttggcggg aacaagaaag ggatcttcac tcgcgaccgc aaaccgaagt cggcggtctt 9480
tctgctgcaa aaacgctgga ctggcatgaa ctctcggtgaa aaaccgcagc agggagcaa 9540
acaatgagag ctgcaatttc ccgcatcggt caaacatttg gcaataaagn ttcttaagat 9600
tgaatcctgt tgccggctct gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc 9660
atgtaataat taacatgtaa tgcatgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag 9720
45 tcccgcattt atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atancgcgca aactaggata 9780
aattatcgcg cgcggtgtca tctatgttac tagatcggga attcccatgc ctcgagcaga 9840
aagatataat atgtaaaaaa atgggtctat atatatggaa ggtttcagga agacaaagg 9900
tctagaaact tccaaaaaaa atccagaata tattttggaa gaaataccct cttgggttgg 9960
50 ccccgccgca gcccttagtg ggccaaaaag ccacgatcta atcccggtct aattggtcta 10020
atagttttaga cttctaatta gacgggctct taattgggtc taattggtct aattagatta 10080
aaatcctaata taaatatgaa cgcaactagg cttccctctc ctctagtttt ctcgagctc 10140
tttttcatgg accttgaagt attgcccgat cactacttcg gaactcgtgg atacttcaga 10200
gtgcacatct actttgaatc ttgattggta gatcatctcg gagaaattct cacagttggg 10260
aggtataacc agttgccgaa attgccatgc ttactcaca gccaggatca gcccatgtcc 10320
55 caaggcaacc cttgtagcta catgccgagg cctgactact tggggcctcg cgccctgcat 10380
ttttgcatgt tcatgtgaca cgttaaagt tgagagaaat agattactaa atatcaccca 10440
tttcgttatt ctgatagagt atcctacaat atgtataccg aaaaatgtat tttaactgt 10500
ggtaggtgag aaagatctat taaaaagaac tctacgtata ctccccctc ccaatcccca 10560
tccagggtttg taagacactt tgcgtttttt ttgcccgaatt ttaaccgtaa atttgactag 10620
60 taaaaataag ttatactgaa tgtaataaat atcgtacatt cggatgttgg agacagggag 10680
aggctggctg gtgcgctgga ttgatcacgg tcagaaagtc tgacttgcaa cgccacaggc 10740
ccgttgattg ccactgacaa ccaagttttc gttgtttcgc tgggtgccata ttttcgcgca 10800
tcgaatattt aaactgcgag gagaaaggca agcaggggcg catatcagca cttgatcact 10860
cactgatcga tcagtagtag ccaccttctc tgcgcccagc tgttatatat tattggcaac 10920
aagtcacatc ttgagaacag aaacaaaaa agaagagaa cattttgag agagttagta 10980
65 cgccgcagcg agtagcctc catctctgac gatcatgcca tacgataaac cgccggcg 11040
cgagaccagt tagcaaggtt gaaatgccaa cacatgtcgc gctcatttct cggcttttcc 11100

37

5 attttgcattg tcgtcatgca ggccttggac actgacattt ctctcttttg ctgttgaatg 11160
aagaccctaa cctttcacca tcagcacgcc cctcaacttg ataagcctag acgaaaccca 11220
tatgcatgat tgatgagtaa tgggtgtgcac gaataattat aaccggtttc caagagcaat 11280
actccattga gatacacctc ctccctgtat ctgttctgtt gtccatttcc catagcagcc 11340
ggcagtggcc ttgactctga ctgccacgca agtaatatat ctttaataaa ctccgtgcct 11400
tgcttctgtg gtccatttgc aaatgcatgc agtgacgaca tgcacatgca tagcttaatt 11460
agctccatgc atccactgct tccattaatc ccctatataa aggactccat atgcctcacc 11520
attcactcat ccaccacagc ttagcagcag caacaaccag tgccatagac actctccatc 11580
aacaaactct agctgatcaa tcctagctaa gcttattaca tagcaagccc ggggatcctc 11640
10 tagagtcgac ctgcaggcgg ccgcactagt gattaggatt ccaacgcgag ccaggacaag 11700
cgaggaaacct tgcgtgcgag gcgaggccgc cccgctccga ttctgattcga cgcgcaggcg 11760
caggcgacgg gatggacgcc ttctactcga cctcgtcggc ggcggcgagc ggctggggcc 11820
acgactccct caagaacttc cgccagatct cccccgcgt gcagtccac ctcaagctcg 11880
tttacctgac tctatgcttt gcaactggcct catctgccgt ggggtgcttac ctacacattg 11940
15 cctgaacat cggcgggatg ctgacaatgc tcgcttgtgt cggactatc gcctggatgt 12000
tctcggtgcc agtctatgag gagaggaaga ggtttgggt gctgatgggt gcagccctcc 12060
tggaaggggc ttcggttggg cctctgattg agcttgccat agactttgac ccaagcatcc 12120
tcgtgacagg gtttgtcgga accgccatcg cctttgggtg cttctctggc gccgccatca 12180
tcgccaagcg cagggagtag ctgtacctcg gtggcctgct ctctctggc ctgtcgatcc 12240
20 tgctctggct gcagtttgtc acgtccatct ttggccactc ctctggcagc ttcattgtttg 12300
aggtttactt tggcctgttg atcttctggt ggtacatggt gtacgacacg caggagatca 12360
tcgagagggc gcaccatggc gacatggact acatcaagca cgccctcaac ctcttcaccg 12420
actttgttgc cgtcctcgtc cgagtcctca tcatcatgct caagaacgca ggcgacaagt 12480
25 cggaggacaa gaagaagagg aagagggggt cctgaacgtw tctccgcac atgtagatac 12540
cgtcaccgcg tcgacctgca ggcattgccg ctgaaatcac cagtctctct ctacaaatct 12600
atctctctca taataatgtg tgagtagttc ccagataagg gaattagggg tcttataggg 12660
tttcgctcat gtgttgagca tataaagaac ccttagtatg tatttgtatt tgtaaaatac 12720
ttctatcaat aaaatttcta attcctaaaa ccaaaatcca gtgggtaccg agctcg 12776

30

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.